



TESE DE DOUTORAMENTO

**IMPACTO DE LA OBESIDAD EN LA
REACTIVIDAD DE LAS PLAQUETAS Y
SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD
CORONARIA**

María Núñez Barrachina

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INVESTIGACIÓN E DESENVOLVEMENTO

DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANO 2020





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Impacto de la obesidad en la reactividad de las plaquetas y su relación con la enfermedad coronaria

Dña. María Núñez Barrachina

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela, 16 de Marzo. de 2020

Asdo. María Núñez Barrachina



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Impacto de la obesidad en la reactividad de las plaquetas y su relación con la enfermedad coronaria

D. Ángel García Alonso

Dña. María Pardo Pérez

INFORMA/N:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **María Núñez Barrachina**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 16 de Marzo de 2020

Asdo. Ángel García Alonso

Asdo. María Pardo Pérez



La presente tesis doctoral ha contado con el apoyo económico de las siguientes fuentes de financiación:

**Financiación otorgada por el Ministerio de Economía y Competitividad,
concofinanciación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional
(FEDER)**

- Financiación otorgada al proyecto SAF2016-79662-R.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



UNIÓN EUROPEA

**Financiación otorgada por la Consellería de Cultura, Educación e
Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia**

- Financiación a Grupos de Referencia Competitiva (GRC2014/011), con cofinanciación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).
- Financiación del Centro singular de investigación de Galicia (acreditación 2016-2019, ED431G/05), con cofinanciación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



XUNTA DE GALICIA

CONSELLERÍA DE CULTURA, EDUCACIÓN
E ORDENACIÓN UNIVERSITARIA



Agradecimientos

Con el permiso de los lectores, para comenzar los agradecimientos me gustaría adaptar una de las frases del Dr. Benjamin Franklin: “la **tesis doctoral** es enfrentar un problema tras otro. La forma en que lo encaras hace la diferencia”. Por ello, me gustaría agradecer todo el apoyo, tanto personal como profesional, de aquellas personas que han permitido que hoy la tesis sea una realidad.

Ante todo, quisiera agradecer la confianza y el apoyo a mis dos directores de tesis, Dr. Ángel García y Dra. María Pardo, porque me habéis enseñado el entusiasmo, la perseverancia y la disciplina que se requiere para el desarrollo de una carrera investigadora.

María, eres todo un ejemplo a seguir para aquellas niñas/mujeres que nos queremos dedicar a la ciencia. Gracias por haber caminado juntas todos estos años.

Ángel, gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, una línea de investigación muy ambiciosa, pero a la vez apasionante, espero haber estado a la altura. También me gustaría darte las gracias por ser el mentor que todo estudiante desearía tener y por compartir tu conocimiento conmigo, guiarme cuando estaba perdida, apoyarme siempre allá donde fuera, y permitirme desarrollar mis propias hipótesis y también llevarlas a cabo.

Asimismo, me gustaría agradecer al *Servizo de Endocrinoloxía*, especialmente al Dr. Martis Sueiro, por todo el conocimiento clínico

que me ha brindado durante estos años y por explicarme con detalle todo lo relacionado con la obesidad y enfermedades asociadas.

No obstante, esta tesis no hubiera sido lo mismo sin las personas que están a mi lado día a día, la importancia de la amistad y el compañerismo son dos aspectos claves en *Platelet Proteomics*. Ante todo, a mis compañeras y amigas, Lidia e Irene, esta tesis también es vuestra. No se puede explicar con palabras la amistad que se ha forjado dentro de estas cuatro paredes, si algo me llevo de esta etapa sois vosotras.

También agradecer a todos aquellos compañeros que han dejado huella durante este camino, Luis, Marcin, María “chiquita”, Paula, Isaac y Sara sé que llegaréis lejos y que el destino nos volverá a unir. A mis “casi compañeros”, el grupo del Prof. Requena, en especial a Sonia, Nuria, Yaiza, Leticia y Daniela, gracias por haberme apoyado siempre en los momentos difíciles y haberme dado un abrazo cuando más lo necesitaba. También al grupo de Obesidómica de IDIS, en especial a Tamara, por estar al pie del cañón con los animales, creo que es una experiencia que nunca olvidaremos.

A todos los miembros del laboratorio CSIC-UAB, pero sobre todo a Montse, tengo tanto que agradecerte tú lo sabes, gracias por llamarme cuando más lo necesitaba y darme un poco de luz cuando todo lo veía todo negro. Tu conocimiento, experiencia y confianza han hecho que tenga unos resultados extraordinarios.

Me gustaría agradecer también a esas amistades que se han ido formando durante esta etapa. Primero que todo a mis amigas/os Alberto, Marta, Ángela R, Ángela F, Sabela y Jess, siempre tuvisteis a mano una sonrisa para alegrarme el día, así que solo puedo darlos las gracias. Tampoco me olvido de aquellas personas que me han ayudado profesionalmente y que ha acabado en amistad, al personal del servicio médico, en especial a Pablo y a Nai; y al personal técnico del CIQUS, en especial a Laura y a Pablo, ¡gracias!

A mi familia, Mamá sé que no ha sido fácil todos estos años y preveo que tampoco serán fáciles los siguientes. Siempre has estado ahí apoyándome para conseguir mi sueño, ser investigadora. Estoy muy orgullosa de ser quien soy y todo esto es en parte gracias a ti.

Papá, gracias por apostar en mí, porque si hace falta acompañarme al otro lado del mundo para ir a un congreso internacional, se hace y punto. Nunca olvidaré lo orgulloso que estabas viendo como tu hija daba una charla en inglés. Gracias de corazón a los dos.

Y por último a mi compañero de aventuras, Juan, gracias por acompañarme durante la batalla final y hacer que todo sea mucho más fácil.





“Without passion, there is no genius”

Theodor Mommsen



Resumen

La obesidad supone en la actualidad uno de los mayores problemas sanitarios de los países industrializados, y en España en particular. En concreto, la obesidad constituye un factor de riesgo para el desarrollo de aterotrombosis, incrementando así la posibilidad de padecer enfermedad coronaria (ej. infarto agudo de miocardio). Las plaquetas juegan un papel fundamental en este aumento de riesgo cardiovascular, ya que los pacientes obesos muestran una hiperactivación plaquetaria y una menor sensibilidad a agentes antiagregantes fisiológicos y farmacológicos.

En la presente tesis se ha querido analizar el impacto de la obesidad en las plaquetas y también en las vesículas extracelulares (VEs) circulantes presentes en el plasma, con vistas a encontrar posibles biomarcadores y/o dianas terapéuticas de riesgo aterotrombótico en obesidad, y aportar nuevo conocimiento sobre los mecanismos moleculares que regulan el funcionamiento plaquetario en dicha patología.

Para descifrar alteraciones en las principales vías de señalización plaquetaria, se realizaron estudios proteómicos y fosfoproteómicos, los cuales identificaron proteínas y lugares de fosforilación relevantes relacionados con activación y agregación plaquetaria, así como el transporte de vesículas, que están alteradas en obesidad. Asimismo, se demostró la existencia de alteraciones en las principales vías de señalización mediadas por la familia de las Src quinasas (SFKs), como es el caso de la vía del receptor de colágeno, glicoproteína VI (GPVI),

y la del receptor de podoplanina, lectina tipo c 2 (CLEC-2). Centrándonos en la vía de GPVI, la presente tesis confirmó que las plaquetas de los pacientes obesos presentan una hiperreactividad en respuesta a colágeno, tanto en agregación como en adhesión plaquetaria, y también una hiperactivación de la vía de señalización. En paralelo, se demostró que existe una sobreexpresión de GPVI total y de su forma activa (GPVI dímero) en la superficie de las plaquetas en obesidad. En línea con los resultados anteriores, se reveló que los niveles de GPVI soluble (GPVIs), indicativos de una hiperactivación de la vía de GPVI, están aumentados en los pacientes obesos. Los resultados citados anteriormente demuestran que existe una alteración en las principales vías de señalización plaquetaria mediadas por SFKs, especialmente la del receptor de colágeno GPVI, en obesidad.

Esta tesis doctoral también abordó el estudio del impacto de la obesidad en los lípidos de la membrana de las plaquetas, revelando que las plaquetas de los pacientes obesos presentan un perfil lipídico alterado comparado con los individuos delgados. De hecho, las plaquetas de los pacientes obesos manifestaron una disminución significativa de los niveles de colesterol, de las ceramidas y del fosfatidilinositol en la membrana plaquetaria, siendo ésta relacionada con un aumento de la microviscosidad e hiperactividad plaquetaria.

En línea con los estudios en humanos, se desarrolló un modelo de obesidad inducido por dieta en ratas. Así, se observó una alteración de las vías de señalización mediadas por SFKs, especialmente GPVI, en

ratas obesas. Los resultados del presente estudio han permitido validar el modelo animal de rata obesa además de correlacionar los resultados con los datos previos obtenidos en pacientes obesos.

Finalmente, en el último apartado de la tesis se estudió el proteoma de las VEs procedentes del plasma por medio de dos aproximaciones proteómicas complementarias en pacientes obesos en comparación con individuos delgados. Se demostró que las VEs de pacientes obesos muestran un proteoma diferencial comparado con los individuos delgados. De esta manera, se propuso un panel de biomarcadores, para el desarrollo de eventos aterotrombóticos en obesidad, compuesto por complemento C3, complemento c4, fibrinógeno y adiponectina, de las cuales las tres primeras se encuentran aumentadas en las VEs de los pacientes obesos y la última disminuida,

En resumen, esta tesis doctoral incluye un exhaustivo análisis del impacto de la obesidad en las plaquetas y las VEs circulantes de pacientes con obesidad. Los resultados obtenidos destacan ciertos posibles biomarcadores y dianas prometedoras para la modulación de la respuesta plaquetaria en dicha enfermedad. Finalmente, cabe resaltar que los obesos presentan un riesgo aterotrombótico que se debería tener en cuenta, y se resalta la importancia de encontrar nuevas dianas terapéuticas, como es el caso de GPVI, en este tipo de pacientes.



ÍNDICES





Índice general

ÍNDICES	16
Índice general	15
Abreviaturas	29
1. INTRODUCCIÓN.....	35
1.1 OBESIDAD.....	37
1.1.1 Clasificación y epidemiología	37
1.1.2 Principales causas de la enfermedad.....	40
1.1.3 El tejido adiposo	41
1.1.4 Obesidad como factor de riesgo.....	44
1.2 PLAQUETAS.....	51
1.2.1 Visión general de las plaquetas.....	51
1.2.2 Señalización plaquetaria: receptores principales.....	55
1.2.2.1 Receptor ITAM: GPVI	61
1.2.2.2 Receptor ITAM: CLEC-2	65
1.2.2.3 Integrinas: Integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$	67
1.2.3 Degranulación plaquetaria.....	70
1.2.3.1 Gránulos densos, gránulos α y lisosomas.....	70
1.2.3.2 Vesículas extracelulares	71
1.1.3 Obesidad y función plaquetaria	74
1.1.3.1 Anomalías plaquetarias	74

1.1.3.2 Hiperactivación plaquetaria.....	77
1.1.3.3 Liberación de VEs.....	80
1.1.3.4 Respuesta a fármacos antiagregantes	81
2. OBJETIVOS	85
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	89
3.1 SELECCIÓN Y RECOGIDA DE MUESTRAS	91
3.1.1 Pacientes con obesidad mórbida	92
3.1.2 Donantes delgados	93
3.2 AISLAMIENTO DE PLAQUETAS	93
3.2.1 Obtención de PRP.....	95
3.3 ESTUDIOS FUNCIONALES CON PLAQUETAS.....	96
3.3.1 Ensayos de agregación.....	96
3.3.2 Ensayos de CFM.....	98
3.3.2.1 Detección de los receptores de membrana mediante el uso de anticuerpos primarios	98
3.3.2.2 Detección de CLEC-2 mediante el uso de <i>nanobodies</i> ..	100
3.3.3 Detección mediante CFM	100
3.3.4 Ensayos de adhesión plaquetaria en placa.....	101
3.4 AISLAMIENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs).....	103
3.5 CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	105
3.5.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	106
3.5.2 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA).....	106
3.5.3 Citometría de Flujo (CMF)	107

3.6 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	109
3.6.1 Lisis de proteínas	109
3.6.2 Precipitación de proteínas	109
3.6.3 Cuantificación de proteína	110
3.6.3.1 Cuantificación de proteína por el método Bradford.....	110
3.6.3.2 Cuantificación de proteína por el método Pierce 660	111
3.6.3.3 Cuantificación de proteína por el método microBCA™ El kit microBCA™ se aplica a muestras que tienen un porcentaje máximo de 5% SDS. El primer paso es la preparación del reactivo: consiste en mezclar MA, MB y MC en una proporción 25:24:1, respectivamente.	112
3.7 ESTUDIOS PROTEÓMICOS.....	113
3.7.1 Métodos basados en gel	114
3.7.1.1 Electroforesis monodimensional (SDS-PAGE)	114
3.7.1.2 Tinción	114
3.7.1.3 Electroforesis bidimensional: 2D-DIGE.....	116
3.7.1.3.1 Marcaje de la muestra con fluoróforos.....	116
3.7.1.3.2 Electroforesis bidimensional	117
3.7.1.3.3 Escaneado de geles y análisis de imagen	119
3.7.1.3.4 Escisión de las proteínas de interés	120
3.7.1.4 Espectrometría de masas acoplada a 2D-DIGE	120
3.7.1.4.1 Digestión en gel.....	121
3.7.1.4.2 MALDI-TOF/TOF.....	122
3.7.1.4.3 LC-MS/MS en trampa iónica	123
3.7.2 Métodos de digestión libres de gel	126

3.7.2.1 Digestión FASP/LFASP.....	126
3.7.2.1.2 Digestión FASP	127
3.7.2.2 Preparación de la muestra para el enriquecimiento de los fosfopéptidos	129
3.7.2.3 Enriquecimiento de péptidos fosforilados mediante TiO ₂	130
3.7.2.4 Espectrometría de masas acoplada a <i>Label Free</i>	131
3.7.2.4.1 LC-MS/MS en LTQ Orbitrap XL.....	131
3.7.2.4.2 Análisis de imagen diferencial mediante Progenesis QI	132
3.7.2.4.3 Análisis de proteómica dirigida mediante Skyline .	133
3.8 HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS DE DATOS	134
3.8.1 Bases de datos	134
3.8.2 Programas de biología de sistemas	135
3.9 ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	135
3.9.1 Activación plaquetaria	135
3.9.2 Inmunoprecipitación de fosfotirosinas (4G10)	136
3.9.3 Inmunodetección de proteína.....	137
3.10 MEDIDA DE LOS NIVELES DE GPVI SOLUBLE Y MARCADORES DE INFLAMACIÓN EN PLASMA	139
3.11 ESTUDIO PILOTO DE LOS LÍPIDOS	140
3.11.1 Aislamiento de plaquetas	141
3.11.2 Homogenizado de las muestras.....	141

3.11.3 Extracción de lípidos: fosfolípidos, ceramidas, esfingolípidos y lípidos neutrales	142
3.11.4 Perfil lipídico de los fosfolípidos, ceramidas y esfingolípidos	142
3.11.5 Perfil lipídico de los lípidos neutros	144
3.12 MODELO ANIMAL: OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA EN RATAS	144
3.12.1 Aspectos éticos de animales de experimentación	145
3.12.2 Diseño experimental	146
3.12.3 Extracción de sangre.....	148
3.12.4 Aislamiento de plaquetas de rata	149
3.12.5 Ensayos de CMF.....	150
3.12.6 Estudios funcionales y bioquímicos en el modelo animal de rata	150
3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	152
4. RESULTADOS.....	155
4.1 ESTUDIO DE LAS PLAQUETAS Y SUS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN PACIENTES CON OBESIDAD	157
4.1.1 Característica de los pacientes	157
4.1.2 Resultados de los estudios proteómicos y bioquímicos	160
4.1.2.1 Estudio del proteoma plaquetario de los pacientes obesos mediante la técnica 2D-DIGE	160
4.1.2.2 Validaciones del estudio del proteoma plaquetario.....	165
4.1.2.3 Estudio de la forma activa de p-Src	166

4.1.2.4 Estudio de la vía del receptor de colágeno GPVI mediante inmunoprecipitación	168
4.1.2.5 Estudio del fosfoproteoma de las plaquetas de pacientes obesos mediante la técnica de <i>label-free</i> LC-MS/MS	169
4.1.2.5.1 Estudio del fosfoproteoma plaquetario en obesidad mediante el enriquecimiento con TiO ₂	170
4.1.2.5.2 Validación de resultados mediante proteómica dirigida	180
4.1.3 Resultados de los estudios funcionales	182
4.1.3.1 Estudio de funcional basado en agregaciones mediante activaciones plaquetarias con diferentes agonistas	182
4.1.3.2 Estudio de diferentes receptores en la superficie de la membrana plaquetaria mediante citometría de flujo (CMF): alteración de los receptores ITAM (GPVI y CLEC-2).	186
4.1.3.3 Estudios de adhesión plaquetaria a diferentes ligandos..	194
4.1.4 Estudio de los niveles de GPVI soluble en plasma	195
4.2 ESTUDIO DE LOS LIPIDOS DE LAS PLAQUETAS EN OBESIDAD	196
4.2.1 Características de los pacientes	198
4.2.2 Los niveles de lípidos neutros están alterados en plaquetas de los pacientes obesos	198
4.2.2 Los niveles de fosfolípidos se encuentran disminuidos en obesidad	200
4.3 ESTUDIO DE LAS PLAQUETAS Y SUS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA.....	202

4.3.1 Características del modelo animal: el modelo DIO imita las características patológicas de la obesidad	203
4.3.2 Establecimiento de un método reproducible de aislamiento de plaquetas en un modelo de rata DIO	206
4.3.3 El perfil proteico de las plaquetas de rata muestra similitudes cuando lo comparas con el perfil humano.....	209
4.3.4 Los niveles de la forma activa de Src (pTyr ⁴¹⁹) están aumentados en el grupo DIO	210
4.3.5 La adhesión plaquetaria al colágeno es mayor en el grupo DIO	211
4.4 ESTUDIO DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs) COMO FUENTE DE BIOMARCADORES	213
4.4.1 Característica de los pacientes	213
4.4.2 Caracterización de las VEs	214
4.4.3 Análisis del proteoma de las VEs circulantes presentes en el plasma de pacientes obesos mediante la técnica 2D-DIGE	217
4.4.4 Análisis del perfil proteómico de las VEs mediante la técnica <i>Label Free</i> LC-MS/MS.....	221
4.4.5 Análisis diferencial del proteoma de las VEs de pacientes obesos e individuos delgados mediante la técnica <i>Label Free</i> LC-MS/MS.....	222
4.4.6 Biología de sistemas	224
4.4.7 Validación del panel de biomarcadores vesiculares: Fibrinógeno y Complemento C3 por inmunodetección.....	226
5. DISCUSIÓN.....	229

5.1 ESTUDIO DEL IMPACTO DE LA OBESIDAD EN LAS PLAQUETAS	233
5.1.1 Estudio de los niveles de activación plaquetaria en obesidad	234
5.1.2 Estudio de los principales lípidos de la membrana plaquetaria en obesidad.	245
5.1.3 Establecimiento de un modelo de rata obesa para el estudio de las plaquetas en obesidad.....	250
5.2 ESTUDIO LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DEL PLASMA EN OBESIDAD	256
6. CONCLUSIÓN.....	263
6.1 ESTUDIO DEL IMPACTO DE LA OBESIDAD EN LAS PLAQUETAS	265
6.2 ESTUDIO DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PROCEDENTES DEL PLASMA EN OBESIDAD	267
7. BIBLIOGRAFÍA	269
8. ANEXOS	309

Índice de figuras

Figura 1: Tipos de obesidad dependiendo el IMC	38
Figura 2: Factores de riesgos asociados a la obesidad	45
Figura 3: Etapas de la activación plaquetaria	54
Figura 4: Principales receptores y vías de señalización involucradas en la activación plaquetaria	58
Figura 5: Vía de señalización del receptor de colágeno GPVI	64
Figura 6: Vía de señalización del receptor de colágeno GPVI	67
Figura 7: Vía de señalización del receptor de fibrinogeno: integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$	69
Figura 8: Vía de secreción a través de VEs	73
Figura 9: Afectación de la función plaquetaria en pacientes obesos	76
Figura 10: Diseño experimental con el modelo animal de obesidad inducida por dieta	147
Figura 11: Análisis del proteoma plaquetario de pacientes obesos frente a controles delgados mediante la técnica 2D-DIGE.	161
Figura 12: Estudio del proteoma plaquetario en obesidad: análisis de las proteínas mediante biología de sistemas.	164
Figura 13: Validaciones por inmunodetección: los niveles de fibrinógeno están aumentados en las plaquetas de los pacientes obesos	165
Figura 14: Inmunodetección de la forma activa de Src: Src ^{Y419} se encuentra sobreexpresada en pacientes obesos.	167
Figura 15: Los niveles de fosforilación de PLC γ 2 se encuentran aumentados en las plaquetas de los pacientes obesos previamente estimuladas con CRP-XL.	169

Figura 16: El análisis diferencial de los péptidos enriquecidos con TiO_2 apunta a que existe una hiperfosforilación en las plaquetas del grupo obeso.	172
Figura 17: Los fosfopéptidos diferenciales entre plaquetas de pacientes obesos y controles delgados se corresponden mayoritariamente a proteínas adaptadoras, receptores y quinasas.	174
Figura 18: El análisis de biología de sistemas destaca la activación plaquetaria y el transporte de vesículas como las principales vías alteradas en obesidad	175
Figura 19: Representación gráfica de los eventos moleculares que ocurren en las plaquetas de los obesos en reposo.	179
Figura 20: Validación de VAMP ^{S55} , Src ^{Y419} , PCK0 ^{S695} , LAT ^{S40/S43} por medio de proteómica dirigida: hiperfosforilación en el grupo obeso.	181
Figura 21: La agregación plaquetaria en respuesta a la activación de GPVI es mayor en las plaquetas de los pacientes obesos comparados con sus controles delgados.	183
Figura 22: El ensayo de agregación muestra diferencias no significativas después de la estimulación con Rhodocytin entre las plaquetas de ambos grupos.	184
Figura 23: El ensayo de agregación muestra diferencias no significativas después de la estimulación con diferentes agonistas entre las plaquetas de ambos grupos	185
Figura 24: Los niveles de expresión de GPVI son más altos en las plaquetas de los pacientes obesos, correlacionando positivamente con el IMC	187
Figura 25: Los niveles de expresión de GPVI dímero son más altos en las plaquetas de los pacientes obesos, correlacionando positivamente con el IMC.	189

Figura 26: Los niveles de expresión de CLEC-2 son más altos en las plaquetas de los pacientes obesos, correlacionando positivamente con el IMC.	190
Figura 27: Existe una correlación positiva entre los niveles de GPVI y CLEC-2 en la superficie de las plaquetas.	191
Figura 28: No existen diferencias significativas en los niveles de integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y GPIb α en la superficie de las plaquetas de los pacientes obesos	192
Figura 29: No existen diferencias significativas en los niveles de p-Selectin en la superficie de las plaquetas de los pacientes obesos	193
Figura 30: Las plaquetas de los pacientes obesos se adhieren más a colágeno que las plaquetas de los controles delgados.	194
Figura 31: Los niveles de GPVI soluble están aumentados en los pacientes con obesidad.	196
Figura 32: La membrana plasmática plaquetaria presenta los niveles de lípidos neutros alterados.	199
Figura 33: Los niveles de fosfolípidos se encuentran disminuidos en la membrana plasmática de las plaquetas obesas.	200
Figura 34: Los niveles de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilserina se encuentran disminuidos en la membrana plasmática de las plaquetas obesas.	201
Figura 35: Análisis de los parámetros del modelo de rata DIO.	204
Figura 36: Análisis de los niveles de glucosa en el modelo de rata DIO	205
Figura 37: Análisis de los parámetros de extracción y aislamiento de plaquetas.	207
Figura 38: Análisis de la eficiencia en la extracción y purificación de las plaquetas.	208
Figura 39: El perfil proteico de las plaquetas de rata muestra similitudes con el perfil humano.	209

Figura 40: Inmunodetección de la forma activa de Src: Src ^{Y419} se encuentra sobreexpresada en el grupo DIO.	210
Figura 41: Las plaquetas del grupo DIO presentan más adhesión frente a colágeno.	212
Figura 42: Caracterización de las diferentes poblaciones de vesículas extracelulares circulantes en las muestras clínicas: microvesículas y exosomas	216
Figura 43: Análisis proteómico diferencial mediante la técnica 2D-DIGE de VEs procedentes de pacientes obesos y sus controles delgados.	218
Figura 44: Análisis de biología de sistemas: alrededor del 70% de las proteínas reguladas de manera diferencial forman parte de una red común, la gran mayoría descrita en VEs.	226
Figura 45: Las validaciones mediante inmunodetección confirma una sobreexpresión de fibrinógeno y complemento C3 en el grupo de los obesos.	228
Figura 46: Representación gráfica de los resultados obtenidos mediante las diferentes aproximaciones (proteómicas, bioquímicas y funcionales) en las plaquetas del grupo obeso y el grupo control.	239

Índice de tablas

Tabla 1: Principales receptores involucrados en activación plaquetaria	56
Tabla 2: Número de individuos que se utilizaron en los estudios de la presente tesis.	92
Tabla 3: Concentraciones de plaquetas utilizados en los diferentes estudios	96
Tabla 4: Agonistas utilizados en ensayos de agregación plaquetaria	97
Tabla 5: Anticuerpos primarios utilizados en los estudios funcionales de CFM	99
Tabla 6: Ligandos y sus concentraciones utilizadas en los estudios funcionales de adhesión estática en placa.	102
Tabla 7: Anticuerpos y cantidad de muestra utilizada en la caracterización de VEs por CMF	108
Tabla 8: Programa del IEF para muestras en tiras IPG de 7 y 24cm	118
Tabla 9: Configuración de la cromatografía líquida y el espectrómetro de masas	124
Tabla 10: Cantidad de muestra digeridas mediante FASP y LFASP	126
Tabla 11: Bases de datos utilizadas en los diferentes estudios proteómicos.	134
Tabla 12: Lista de anticuerpos utilizados en esta la tesis doctoral	139
Tabla 13: Características clínicas de los pacientes/participantes en el estudio proteómico basado en la técnica 2D-DIGE.	158
Tabla 14: Características clínicas de los pacientes/participantes en el estudio fosfoproteómico basado en <i>label free</i> LC-MS/MS.	159
Tabla 15: Características clínicas de los principales pacientes/participantes en los estudios de validación y estudios funcionales.	159

Tabla 16: Estudio del proteoma plaquetario mediante 2D-DIGE: lista de proteínas identificadas que se encuentran reguladas de manera diferencial en pacientes obesos.	162
Tabla 17: Estudio del fosfoproteoma plaquetario: lista de fosfoproteínas identificadas de manera diferencial que tienen una función descrita.	176
Tabla 18: Características clínicas de los pacientes/participantes recogidos en el estudio lipídico.	198
Table 19: Características del modelo animal: ratas <i>Sprague-Dawley</i> después de ser alimentadas con dieta estándar o alta en grasa durante 9 semanas.	205
Tabla 20: Características clínicas de los pacientes/participantes recogidos en ambas aproximaciones proteómicas (técnicas 2D-DIGE y <i>label free</i> LC-MS/MS).	214
Tabla 21: Estudio del proteoma de las VEs: lista de fosfoproteínas identificadas de manera diferencial mediante la técnica 2D-DIGE	219
Tabla 22: Estudio del proteoma de las VEs: lista de proteínas identificadas de manera diferencial mediante la técnica <i>Label Free</i> LC-MS/MS.	223
Tabla 23: Resumen del panel de proteínas derivadas de VEs identificadas en ambas aproximaciones	257

Abreviaturas

2D-DIGE – Electroforesis diferencial en gel

5HT – 5-hidroxitriptamina

AA – Ácido araquidónico

ACD – Ácido-citrato-dextrosa

ACN – Acetonitrilo

ADP – *Adenosine Diphosphate*

AF – Ácido fórmico

AGL – Ácidos grasos libres

AMPc – Adenosín monofosfato cíclico

AMPc – AMP cíclico

ATC – Ácido tricloroacético

BSA – Albúmina de suero bovino

C.I.% – Intervalo de confianza

CC – Circunferencia de la cintura

CHAPS – [3-[(3-Colaamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato](3-[(3-cholamidopropil)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)

CLEC-2 – Lectina tipo C 2

CMF – Citometría de flujo

CRP – *Collagen-related peptide*

CT – Circunferencia cintura/talla

ECV – Enfermedades Cardiovasculares

DAG – Diacilglicerol

DDA – *Data dependent acquisition*

DIO – Obesidad inducida por dieta

DM – Diabetes mellitus

DTT – Ditiotreitól

Ej. – Ejemplo

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ENPE – Estudio Nutricional de la Población Española

FASP – *Filter-Aided Sample Preparation*

FC – Variación de expresión

FPR – Razón de falsos positivos

FSC – *Foward scatter*

G – Glicina

g – Gramos

GEFs – *Guanine nucleotide exchange factors*

GMPc – Guanosín monofosfato cíclico

GPCRs – Receptores acoplados a proteína G

GPVI – Glicoproteína VI

GPVIs – GPVI soluble

GPVI/FcR γ – Glicoproteína VI y la cadena γ del receptor Fc

H – Hora

HPLC – *High pressure liquid chromatography*

IAA – Iodoacetamida

IAMCEST – infarto agudo de miocardio con elevación ST

IDIS – Unidad de Proteómica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago

IEF – Isoelectroenfoque

Ig – Inmunoglobulina

IGF-1 – Insulin-like growth factor

IL-6 – interleukina 6

IMC – Índice de masa corporal

IP – Inmunoprecipitación

IP₃ – Inositol trifosfato

ISEV – *International society of Extracellular Vesicles*

ITAM – Motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina

KBr – Bromuro potásico

kCal – Kilocalorías

LC-MS/MS – Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

LDL – Lipoproteína de baja densidad

mA – Miliamperios

MAP – *Mitogen-activated protein*

MFI – Intensidad mediana de fluorescencia

miARN – MicroARN

Min – Minutos

MMP- Metaloproteinasas

MPs – Micropartículas

mRNA – Ácido ribonucleico mensajero

MS – Espectrometría de masas

MTB – *Modified Tyrode's Buffer*

MVs – Microvesículas

NR – No retenido

O – Hidroxiprolina

OMS – Organización mundial de la salud

ON – Óxido nítrico

P – Prolina

PAF – Receptor del factor de activación plaquetaria

PAS – Bolitas recubiertas de proteína A

PBS – Tampón fosfato salino

PC – fosfatidilcolina

PDVF – Polifluoruro de vinilideno

PE – fosfatidiletanolamina

PFP – Plasma libre en plaquetas

PGI₂ – Prostaglandina I₂

PI – fosfatidilinositol

PKA – Proteína quinasa A

PKC – Proteína quinasa C

PLC γ 2 – Fosfolipasa C gamma 2 –

PLT – Contaje plaquetario

PNPP – P-nitrofenilfosfato

PPP – Plasma pobre en plaquetas

Prof. – Profesor

PRP – Plasma rico en plaquetas

PIP₂ – Fosfatidilinositol bisfosfato

PS – Fosfatilserina

PTM – Modificación post-traducciona

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Especies reactivas de oxígeno

Ser – Serina

SFKs – Familia de las Src quinasas

SM – esfingomielina

T2DM – Diabetes mellitus tipo 2

TAB – Tejido adiposo blanco

TAP – Tejido adiposo pardo

TAS – Tejido adiposo subcutáneo

TAV – Tejido adiposo visceral

TBS-T – Solución salina tamponada con tris

TEM – Microscopía electrónica de transmisión

TFA – Ácido trifluoroacético

Tir – Tirosina

Tre – Treonina

TSP1 – Trombospondin-1

TXA2 – Tromboxano

V – Voltios

VEs- Vesículas extracelulares

VPM – Volumen plaquetario medio

VRP – Razón de verdaderos positivos

FvW – Factor de von Willebrand

WCRF – *World Cancer Research Fund*





1. INTRODUCCIÓN



1.1 OBESIDAD

1.1.1 Clasificación y epidemiología

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal. Viene descrita por el Índice de Masa Corporal (IMC) que se mide mediante el peso en kilogramos del individuo (kg) dividido por la altura del mismo en metros al cuadrado.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los tipos de obesidad dependiendo del rango de IMC: obesidad mórbida ($\text{IMC} > 40$), obesidad tipo II ($40 < \text{IMC} < 35$) y obesidad tipo I ($35 < \text{IMC} < 30$) (**Figura 1**). Sin embargo, se ha empezado a cuestionar si el IMC es un índice correcto para determinar dicha patología ya que relaciona solamente el peso y la altura del individuo, siendo incapaz de diagnosticar la grasa corporal y por tanto el estado de salud del mismo.

Dado que este método es limitado, se estima recomendable la combinación de otros métodos capaces de realizar mediciones directas, en especial de la acumulación de tejido adiposo visceral. La grasa visceral predice mejor los riesgos cardiometabólico y de mortalidad que el acúmulo de grasa subcutánea (1). Por ello, se han establecido otras medidas antropométricas, como es el caso de la circunferencia de la cintura (CC), que permite valorar los niveles de grasa visceral (2).

Actualmente en la práctica clínica, se determina la CC ya que es fácil de medir, y muestra una buena asociación con los factores de riesgo cardiovascular, con el riesgo relativo para desarrollar cardiopatía

isquémica y con la mortalidad cardiovascular de forma independiente al IMC (3). Los umbrales de riesgo propuestos por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos son de 102 cm para varones y 88 cm para mujeres (2).

Cabe destacar que se ha establecido otro parámetro antropométrico para medir la grasa visceral que relaciona la circunferencia de la cintura y la talla (CT). De hecho, estudios recientes apuntan a que CT presenta una serie de ventajas frente a la CC y al IMC. El CT permite presuponer una cantidad de grasa aceptable dependiendo de la altura, estableciendo puntos de corte independientemente del sexo y de la edad (4).

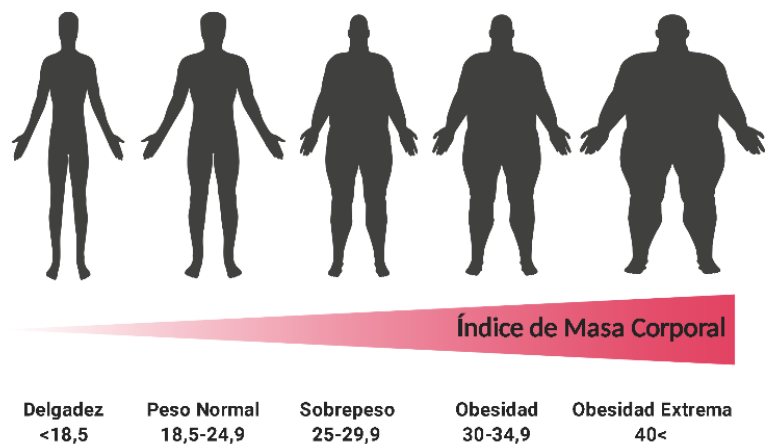


Figura 1: Tipos de obesidad dependiendo el IMC

La obesidad es un problema de salud a nivel mundial, tanto en prevalencia, como en impacto socioeconómico (5). Según los datos de la OMS, alrededor de 650 millones de personas padecen obesidad, es decir aproximadamente el 13% de la población adulta, estando a su vez asociada a comorbilidades como diabetes mellitus (DM), enfermedades cardiovasculares (ECV), cáncer e hipertensión, entre otras.

La obesidad se ha triplicado en los últimos años, este aumento permite proyectar un potencial incremento continuo de la mortalidad en las próximas décadas. Si estos valores siguen constantes alrededor del 50% de la población sufrirá sobrepeso u obesidad en 2030 (6).

En el caso de España, la prevalencia de la obesidad es alta, aumenta con la edad, es más elevada en mujeres que en varones y presenta una distribución desigual entre comunidades autónomas. A pesar de que la prevalencia sea considerablemente alta (21,6%), se sitúa por debajo de las cifras de Estados Unidos, país en el que la prevalencia de obesidad en población mayor de 20 años alcanza el 36,5% (7). Según el Estudio Nutricional de la Población Española (ENPE) de 2016, las cifras más altas de obesidad se encuentran en el Principado de Asturias y Galicia, seguidas por Andalucía y Región de Murcia, mientras que la prevalencia en Canarias parece haberse estabilizado en un 20,1% (8).

El impacto socioeconómico de esta enfermedad está siendo también un inconveniente para la sociedad ya que implica unos costes adicionales sobre todo en el sistema nacional de salud. Existen estudios que relacionan el IMC con los costes asociados a la enfermedad y

determinan una menor productividad en el trabajo, mayor mortalidad y una permanente discapacidad dando lugar a una disminución del crecimiento económico global (9). Por tanto, esta enfermedad es un problema a nivel mundial y ha hecho que la OMS haya desarrollado estrategias para paliar la incidencia. Un ejemplo es el Plan de Acción Mundial para la Prevención y el Control de las Enfermedades No Transmisibles 2013-2020, donde se ha fijado como objetivo detener la incidencia de obesidad entre 2010 y 2025 (10).

1.1.2 Principales causas de la enfermedad

La obesidad se describe como un desequilibrio en el balance energético, donde se consumen más calorías de las que se gastan. En su etiopatogenia, la obesidad se considera una enfermedad multifactorial ya que se puede desarrollar a causa de factores ambientales, genéticos, metabólicos y endocrinos.

Los factores ambientales, como los cambios en la dieta y la ausencia de ejercicio físico, son las principales causas del aumento exacerbado de peso en la población mundial. Durante las últimas décadas, los malos hábitos alimentarios se han visto afectados. Actualmente, se ingiere una gran cantidad de alimentos ultraprocesados ricos en grasa y azúcar, ya que son más accesibles y baratos si se compara con alimentos frescos como la fruta y la verdura (11). Así mismo, otro factor ambiental importante es la disminución de actividad física, fruto del estilo de vida sedentario en el que vivimos. La

automatización laboral, el uso de transporte y el estilo de vida urbano han hecho que la población en general haga menos consumo de energía de la que ingiere (11).

Existen otros factores que también pueden contribuir al aumento de peso como la genética, el metabolismo y factores endocrinos. Cabe destacar que existen estudios que confirman que alteraciones en la regulación de diferentes hormonas puede causar de manera secundaria la acumulación excesiva de grasa (12). De hecho, se ha descrito que el 2-3% de los obesos presentan una patología endocrinológica asociada. Por otro lado, los factores genéticos pueden influenciar en el gasto energético, el metabolismo y el apetito; sin embargo, no es un factor que pueda participar específicamente en el aumento de peso corporal (11).

1.1.3 El tejido adiposo

El tejido adiposo fue considerado durante mucho tiempo como el almacén energético del organismo, en donde se acumulaban los excedentes de energía consumidos y se movilizaban según la demanda. Sin embargo, durante esos años ya surgían voces que reclamaban un papel más activo de este tejido, llegando a postularse que podría funcionar a modo de órgano endocrino, sintetizando una serie de hormonas que podrían estar implicadas directamente en alteraciones relacionadas con la obesidad y sus comorbilidades (13, 14).

El tejido adiposo está principalmente compuesto por adipocitos, aunque existen otros tipos celulares minoritarios en este tejido como son los fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y preadipocitos. Hay diferentes tipos de adipocitos, que se clasifican en tres principales: adipocitos blancos, marrones y beis. Los primeros son los componentes principales del tejido adiposo blanco, mientras que los adipocitos marrones son característicos del tejido adiposo pardo. Recientemente, en el año 2010 se descubrieron los adipocitos beis, que son un tipo de adipocito con características similares a los marrones situados en el tejido adiposo blanco y cuyo origen y funciones todavía están poco definidas (15).

En términos generales el tejido adiposo se puede clasificar en 3 tipos: tejido adiposo blanco (TAB), tejido adiposo pardo (TAP) y tejido adiposo de la médula ósea (médula ósea amarilla). La presente introducción se centrará en el TAB y el TAP, dada su relevancia en los estudios endocrinos.

Tejido adiposo blanco (TAB)

El TAB es uno de los tipos más abundantes del organismo, llegando a suponer más de la mitad del peso corporal en situaciones de obesidad (16). Este tejido también presenta una importante función endocrina de regulación de la homeostasis energética ya que tradicionalmente se ha definido como el mayor almacén de energía del cuerpo. Durante periodos de incremento de la ingesta o de poca demanda energética, la

energía sobrante es depositada en el TAB en forma de triglicéridos. Además, el TAB es un órgano endocrino altamente activo que secreta una amplia variedad de péptidos bioactivos, conocidos como adipoquinas, que actúan tanto a nivel local (función autocrina/paracrina) como a nivel sistémico (función endocrina) (17). De hecho, los patrones de secreción de las adipoquinas reflejan la función del tejido adiposo y suponen unos biomarcadores muy importantes que determinan el riesgo de un individuo a padecer enfermedades metabólicas y/o cardiovasculares relacionadas con la obesidad (18).

Este tejido se encuentra localizado en diferentes regiones anatómicas en mayor o menor cantidad, y según su localización recibe distintos nombres: tejido adiposo visceral (TAV) y tejido adiposo subcutáneo (TAS). De hecho, la distribución del tejido adiposo parece ser un factor clave en el riesgo a desarrollar enfermedades relacionadas con la obesidad, más importante incluso que el total de tejido adiposo corporal de un individuo (19).

Metabólicamente los distintos depósitos de tejido adiposo se comportan de manera diferente según su localización. Actualmente se ha demostrado que el incremento en el TAV está asociado a un aumento en el riesgo de padecer enfermedades asociadas con la obesidad y existe una correlación directa entre los niveles de adiposidad y los niveles de resistencia a la insulina (19). Por otro lado, el TAS protege frente a los efectos lipotóxicos del almacenamiento a corto y largo plazo de

triglicéridos. A nivel celular, los adipocitos del TAV son lipolíticamente más activos y presentan una mayor cantidad de mitocondrias que los adipocitos del TAS (19).

Tejido adiposo pardo (TAP)

El TAP se localiza comúnmente en la región supraclavicular cervical, en la región ventral del cuello y en las regiones superficial y lateral a los músculos esternocleidomastoideos. La presencia de este tejido en adultos está relacionada directamente con la edad, más del 50% de las personas de entre 20-30 años presentan TAP activo, pero a medida que aumenta la edad, este porcentaje se va reduciendo, detectándose este tejido únicamente en un 10 % de los individuos analizados de 50-60 años (20).

El TAP secreta una serie de adipoquinas compartidas con el TAB, como la leptina, adiponectina o resistina, aunque las cantidades son pequeñas en comparación con el TAB (21).

1.1.4 Obesidad como factor de riesgo

La obesidad se caracteriza por presentar un aumento de la masa adiposa debido a un balance energético positivo mantenido en el tiempo. El incremento en el volumen del tejido adiposo se acompaña de otros cambios en las características biológicas habituales del mismo, entre ellas que se vuelve disfuncional. El depósito visceral de la grasa, la hipertrofia y el cambio del perfil secretor de los adipocitos, junto con la

infiltración del tejido adiposo por células inflamatorias son algunas de las características que determinan una comunicación alterada del tejido adiposo con otros órganos. De hecho, se ha planteado que la disfunción del tejido adiposo explicaría parte de la etiopatogenia de las enfermedades metabólicas y cardiovasculares asociadas a obesidad (**Figura 2**) (22).

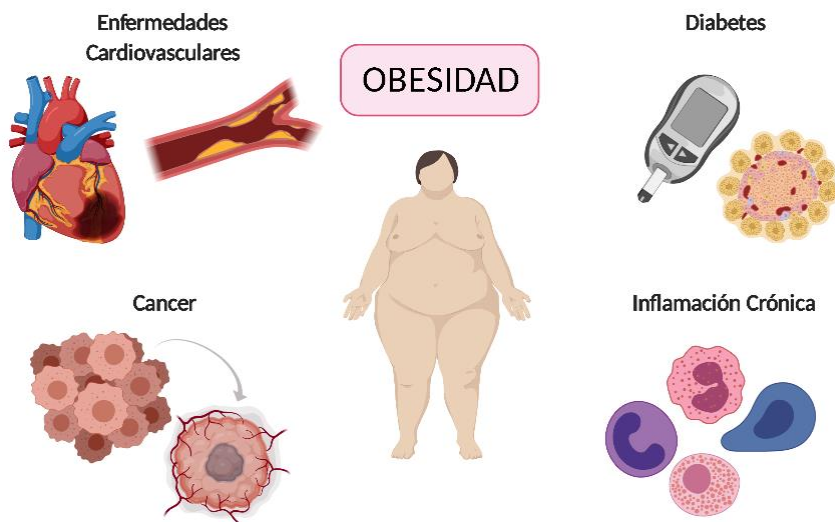


Figura 2: Factores de riesgos asociados a la obesidad

Inflamación Crónica

La obesidad es un estado de inflamación crónica de bajo grado. El desencadenamiento de la inflamación en obesidad se asocia al estrés homeostático causado por el balance positivo de energía, dando lugar a

un aumento del tamaño de los adipocitos (23). Esta hipertrofia conlleva alteraciones metabólicas del mismo generando en última instancia apoptosis. En este sentido, la expansión patológica del tejido adiposo en la obesidad se acompaña de un aumento en el reclutamiento de macrófagos y otras células del sistema inmune de perfil proinflamatorio, alterando el microambiente celular, y generando un estado de inflamación tisular conocido como lipoinflamación. Este fenómeno daría lugar a una mayor secreción de adipocinas proinflamatorias, así como alteraciones en los componentes de la matriz extracelular del tejido adiposo, que agravan la inflamación sistémica de los individuos obesos y contribuye a una larga variedad de patologías asociadas (24).

De hecho, los obesos adultos muestran los niveles de citoquinas circulantes alterados, entre ellos cabe destacar la interleukina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF- α), complemento C3, adiponectina y proteína C reactiva (25, 26). Asimismo, estos factores se han relacionado con el desarrollo de otras enfermedades como la resistencia a insulina, desordenes metabólicos y el aumento del riesgo cardiovascular. Además, el exceso de grasa corporal está acompañado por un aumento en los niveles de leucocitos, neutrófilos, monocitos y linfocitos en sangre favoreciendo el estado proinflamatorio del individuo obeso (27, 28).

Diabetes Mellitus (DM)

DM es un síndrome caracterizado por anomalías en el metabolismo de carbohidratos y grasas y también por presentar una hiperglucemia crónica. Existen dos tipos de diabetes: diabetes tipo 1, el organismo no produce insulina y diabetes tipo 2 (T2DM) el organismo produce poca insulina o las células no hacen uso de ella. La prevalencia de T2DM está estrechamente relacionada con el aumento significativo de la obesidad. De hecho, se estima que alrededor del 90% de T2DM está atribuido a un exceso de peso del individuo (29). Dentro de la fisiopatología que conecta ambas enfermedades se encuentran dos factores importantes: la resistencia y la deficiencia a la insulina.

La resistencia a la insulina se conoce como una condición patológica en la cual el cuerpo no es capaz de responder a la cantidad de la hormona insulina que produce. Por otro lado, la deficiencia de insulina es definida como una condición patológica en la cual hay un decrecimiento inapropiado en la secreción de insulina por parte de las células beta.

Asimismo, la obesidad genera una elevación permanente de ácidos grasos libres (AGL) en el plasma dando lugar a una mayor resistencia a insulina (30). De hecho, niveles altos de AGL en plasma induce a una inhibición de la actividad transportadora de glucosa dando lugar a una alteración en la respuesta a la insulina. Por otro lado, Ravussin y colaboradores demostraron que al aumentar la ingesta de grasa, ésta produce una disfunción de las células beta pancreáticas que

daría lugar de manera gradual a una resistencia a la insulina, a un cambio en el metabolismo de la glucosa y por último el desarrollo de la diabetes (31, 32). Hay que tener en cuenta que la evolución de la resistencia a insulina hacia diabetes va acompañada con una inflamación sistémica y un estrés oxidativo asociado. Por lo que cada vez existen más evidencias que sugieren que la inflamación crónica en el tejido adiposo afecta de forma directa a la patogénesis de la diabetes en los pacientes obesos (33).

A modo de resumen, tanto la obesidad como la diabetes son dos importantes retos sanitarios de los últimos años, por lo que se necesitarán nuevos estudios para poder caracterizar mejor la interacción de ambas enfermedades y el tratamiento de las mismas.

Cáncer

El cáncer se conoce como la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos. Durante los últimos años, se ha demostrado que la obesidad es un factor de riesgo para ciertos tipos de cáncer. Un artículo publicado por la *World Cancer Research Fund* (WCRF) concluyó que existen claras evidencias por las cuales tener sobrepeso u obesidad aumenta el riesgo de padecer 12 tipos diferentes de cáncer: colorrectal, de mama, adenocarcinoma, de hígado, ovario, páncreas, entre otros (34, 35). También ha demostrado que la pérdida de peso reduce la incidencia del cáncer en el individuo obeso

(36, 37). Sin embargo, aunque las evidencias epidemiológicas son fuertes, los mecanismos por los cuales se desarrolla la relación entre ambas enfermedades no son del todo claros.

Actualmente, se han postulado los siguientes mecanismos por los cuales la obesidad podría promover cáncer : 1) niveles elevados de factores de crecimiento como insulina e *insulin-like growth factor* (IGF-1); 2) aumento de hormonas esteroideas como estrógenos y factores que afectan a su metabolismo; 3) niveles alterados de adipocinas como leptina y adiponectina que provienen de una desregulación del balance energético; 4) inflamación crónica y estrés oxidativo que promueve la modulación de citoquinas; y por último 5) alteración de la microbiota (38).

Además, los pacientes obesos presentan una peor respuesta ante las terapias contra el cáncer siendo la efectividad de la radioterapia/quimioterapia reducida ya que es muy complicado ajustar el volumen de radiación o la dosis que necesita el paciente (39, 40).

En resumen, existen evidencias claras por las cuales la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer y para la respuesta del paciente a los diferentes fármacos. Por ello, es necesario encontrar nuevos tratamientos que reduzcan los efectos negativos de la obesidad en el desarrollo del cáncer.

Enfermedades Cardiovasculares (ECV)

La acumulación excesiva de grasa conduce a diversas consecuencias, como por ejemplo cambios metabólicos, que dan lugar a una prevalencia del riesgo cardiovascular (41). En los últimos años, la obesidad ha estado asociada a numerosas ECV como es el caso de la aterosclerosis, la insuficiencia cardíaca o la fibrilación auricular. La aterosclerosis es la formación de placa de ateroma en los vasos sanguíneos que aparece como respuesta a una lesión del endotelio vascular (42); ésta es la causa principal de la enfermedad coronaria y cerebrovascular, dos de las principales morbilidades a nivel mundial. En la última década, el interés de correlacionar ambas enfermedades ha aumentado exponencialmente, sin embargo, sigue habiendo muchas cuestiones que están aún sin resolver.

Estudios clínicos han demostrado que los obesos tienen 2 veces más riesgo a sufrir complicaciones cardiovasculares que un individuo delgado; lo que confirma que existe una relación directa entre los niveles de grasa y las ECV (43, 44).

La relación entre la obesidad y la aterosclerosis se extiende más allá de su asociación al riesgo cardiovascular ya que comparten vías fisiopatológicas similares además ambas son consideradas enfermedades inflamatorias crónicas caracterizadas por la activación de la inmunidad adaptativa e innata (45).

Dentro de la patogénesis, la acumulación de lípidos y ácidos grasos, la producción de citoquinas y la muerte celular hace que se

desarrolle el proceso inflamatorio en los pacientes obesos. Este proceso participa en todas las fases de la aterosclerosis: desde la disfunción endotelial hasta las complicaciones causadas por las placas de ateroma. De hecho, estudios recientes han demostrado que la obesidad contribuye a la formación y vulnerabilidad de la placa de ateroma a través del estado de inflamación e hiperlipidemia presentes en el individuo obeso (46).

Por otro lado, diferentes grupos de investigación reiteran que el individuo obeso presenta un desequilibrio en la liberación de adipocinas presentando unos niveles más altos de las mismas (47-49). Existe un gran número de ellas, entre las más importantes se encuentran IL-6, TNF- α , leptina y resistina (50). La presencia de estas moléculas proinflamatorias hace que se desencadenen diferentes cascadas metabólicas e inmunológicas contribuyendo así a la generación de un trombo (51). Diferentes grupos de investigación han descrito que los niveles alterados de estas moléculas contribuyen a la disfunción endotelial, al aumento del estrés oxidativo, a la hipercoagulación, disfunción en la fibrinólisis y a la hiperreactividad plaquetaria (46).

1.2 PLAQUETAS

1.2.1 Visión general de las plaquetas

Las plaquetas son células sanguíneas carentes de núcleo que se caracterizan por tener un tamaño reducido de 1-2 μm . Son generadas en la médula ósea a partir de una célula precursora llamada megacariocito.

Los megacariocitos son células hematopoyéticas poliploides exclusivas de mamíferos que residen fundamentalmente en la médula ósea y generan/liberan plaquetas al torrente sanguíneo (52). El intervalo fisiológico de las plaquetas se encuentra alrededor de $150-400 \times 10^9/L$ y tienen una vida media de 7 a 10 días.

La principal función de las plaquetas es mantener la integridad vascular y la hemostasia reparando los daños que se producen en las paredes de los vasos sanguíneos y evitando las pérdidas de sangre en el sistema circulatorio. Además, se ha demostrado que las plaquetas pueden estar implicadas en otros procesos biológicos tales como cáncer, inflamación e inmunidad (53).

Bajo condiciones normales, las paredes del endotelio constituyen una superficie no adherente para las plaquetas ya que circulan por el torrente sanguíneo en un estado de reposo. Ese estado ocurre gracias a la ayuda de moléculas como el óxido nítrico (ON), prostaglandina I_2 (PGI_2) y la ADPasa que inhiben la función plaquetaria (54). El ON y la PGI_2 se encargan de mantener las plaquetas en un estado inactivo gracias al aumento de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y adenosin monofosfato cíclico (AMPc). Por otro lado, la ADPasa permite hidrolizar el ADP soluble impidiendo que se desencadene la activación plaquetaria (55).

Cuando se produce un daño en el endotelio, se exponen a la luz diferentes componentes subendoteliales de la matriz extracelular como el colágeno o el Factor de von Willebrand (FvW) que, al interaccionar

las plaquetas, estas se activan produciéndose un cambio estructural en las mismas. El proceso de activación es complejo y se puede dividir en tres fases: adhesión, activación y agregación (**Figura 3**).

Adhesión

En condiciones de daño vascular se produce la pérdida de las señales inhibitorias y la liberación de moléculas que promueven la activación plaquetaria. El colágeno expuesto en la matriz extracelular se une al FvW del plasma permitiendo su unión con el complejo GPIb-V-IX. La interacción entre este complejo y FvW da lugar a una disminución de la velocidad de las plaquetas en circulación, favoreciendo la interacción de las mismas con el endotelio a través de la glicoproteína VI (GPVI) y la integrina $\alpha 2\beta 1$.

Activación

La activación comienza con la interacción entre el colágeno y el receptor GPVI a través de la región glicina-prolina-hidroxiprolina (GPO), permitiendo una firme adhesión y secreción de sustancias procoagulantes y proinflamatorias por parte de las plaquetas. Una de las consecuencias de esta unión receptor-ligando es la liberación del dominio extracelular del mismo a través de metaloproteinasas (MMP), lo que genera moléculas solubles en el plasma como GPVI soluble (GPVIs). Se ha visto que los niveles de GPVIs son directamente proporcionales a los niveles de activación de la vía de señalización (56).

Además, la interacción entre el colágeno y GPVI promueve la agrupación del receptor, desencadenando la vía de señalización mediada por fosforilaciones a través de tirosinas quinasas.

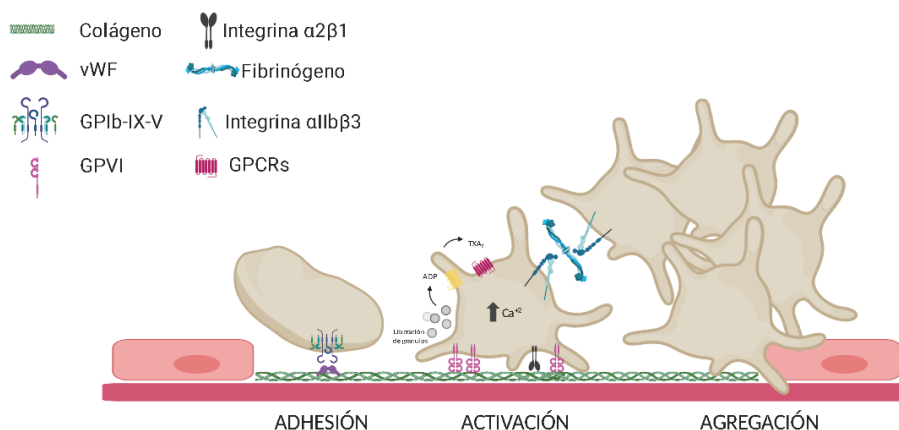


Figura 3: Etapas de la activación plaquetaria

La señalización de GPVI conduce a la activación de la fosfolipasa C gamma 2 (PLC γ 2) lo que genera un aumento de los niveles de Ca^{+2} intracelular y provoca la desgranulación plaquetaria. El aumento de Ca^{+2} intracelular da lugar a un cambio conformacional de la integrina $\alpha IIb \beta 3$ a su forma activa, favoreciendo así el proceso de señalización “inside-out”(57, 58). Por otro lado, los gránulos α y gránulos densos contienen una gran cantidad de factores de refuerzo

positivo como fibrinógeno, FvW, ADP y serotonina, que favorece a la activación completa de la vía (59).

Agregación

Una vez la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ se encuentra en su conformación activa, comienza el reclutamiento de las plaquetas. Éstas se adhieren unas a otras gracias a los puentes formados por la unión de fibrinógeno, fibrina y FvW. La unión receptor-ligando desencadena la activación del receptor “fuera-dentro” que culmina con una potente activación plaquetaria, responsable de la remodelación del citoesqueleto y que favorece a la formación del tapón hemostático (60).

A modo de resumen, el papel de las plaquetas en la hemostasia ha sido ampliamente descrito durante décadas. Los avances en nuevas técnicas de microscopia, bioquímicas, y el uso de modelos animales han proporcionado el conocimiento necesario para destacar la complejidad de las plaquetas y por tanto seguir estudiándolas en profundidad.

1.2.2 Señalización plaquetaria: receptores principales

Las plaquetas circulan por los vasos sanguíneos en un estado de reposo como ya se dijo anteriormente. Sin embargo, cuando se produce cierto estímulo (fisiológico o patológico) se activan a través de diferentes vías de señalización dando lugar a la formación del tapón hemostático o trombo.

Aunque existen diferentes vías de activación plaquetaria, todas ellas tienen una serie de eventos de señalización común. Dependiendo

de la estructura y la vía de señalización asociada existen cuatro tipos diferentes de receptores: el complejo GPIb-IX-V, receptores acoplados a proteína G (GPCRs), receptores con dominios ITAM (motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina) e integrinas de membrana (**Figura 4**).

Tabla 1: Principales receptores involucrados en activación plaquetaria.

RECEPTOR	LIGANDO	TIPO	SEÑALIZACIÓN
$\alpha 2\beta 1$	Colágeno	Integrina/Glicoproteína	Tirosina-quinasa
GPVI	Colágeno	Glicoproteína	Tirosina-quinasa
$\alpha IIb\beta 3$	Fibrinógeno / FvW	Integrina/Glicoproteína	Tirosina-quinasa
GPIb	FvW	Glicoproteína	Tirosina-quinasa
CLEC-2	Podoplanina	Lectina	Tirosina-quinasa
P2Y ₁	ADP	GPCR	Gaq
P2Y ₁₂	ADP	GPCR	Gai
TP	TXA ₂	GPCR	Gaq, Ga12/13
PAR-1	Trombina	GPCR	Gaq, Ga12/13
PAR-4	Trombina	GPCR	Gaq, Ga12/13

Complejo GPIb-IX-V

El **complejo GPIb-IX-V** está compuesto por cuatro proteínas transmembrana tipo 1: GPIb α , GPIb β , GPIX y GPV. Su función principal es mediar la interacción entre la plaqueta y la pared vascular uniéndose al FvW que se encuentra inmovilizado en la superficie de colágeno de la matriz subendotelial. Tras la unión, comienza la

activación aguas abajo del receptor, donde intervienen de manera secuencial: la familia de las Src quinasas (SFKs), la activación de PLC γ 2, la formación de diacilglicerol (DAG) y la activación de la proteína quinasa C (PKC) (54). También se conoce que GPIb activa la vía de p38-MAP (*mitogen-activated protein*) quinasa dando lugar a cambios en el citoesqueleto, la desgranulación plaquetaria y el cambio conformacional de la integrina α Ib β 3. A parte de FvW, también se puede unir a otras moléculas como factor XII, P-selectin, MAC-1 permitiendo modular otros procesos vasculares a parte de la activación plaquetaria (ej. inflamación).

GPCRs

GPCRs son una familia de proteínas de membrana formada por siete dominios transmembrana los cuales después de su activación desencadenan una señalización intracelular a través de proteínas G. Una vez se produce la unión proteína-ligando, se produce un cambio conformacional que dará lugar a la propagación de la señal. Existen diferentes tipos de GPCRs: $G\alpha_{i/o/z}$, $G\alpha_q$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_{q/11}$ (61).

$G\alpha_q$, una vez activado se une a PLC β que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol bisfosfato (PIP $_2$) generando inositol trifosfato (IP $_3$) y DAG. Esta señalización es crítica para la agregación en respuesta a trombina, ADP, 5-hidroxitriptamina (5HT), receptor del factor de activación plaquetaria (PAF) y tromboxano (TXA $_2$). Además, está involucrado indirectamente en la señalización mediada por colágeno

dado que juega un papel crucial en la amplificación de la señal inducida por TXA_2 (62).

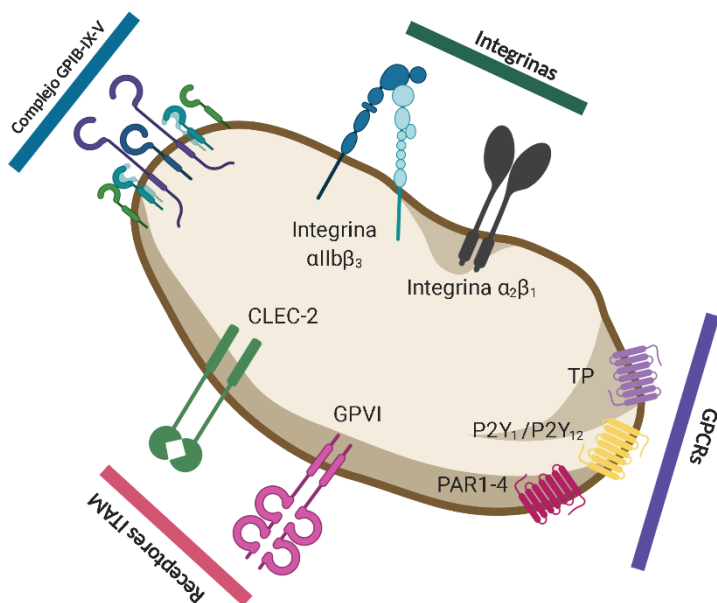


Figura 4: Principales receptores y vías de señalización involucradas en la activación plaquetaria

G $\alpha_{12/13}$, la ruta clásica mediada por esta señalización es la activación de las GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) que da lugar a la fosforilación de la miosina y la contracción dependiente de la actina-miosina.

G α_i , y G α_s , los receptores más conocidos de esta familia son el receptor de ADP (P2Y₁₂) y el receptor de PGI₂. Ambos receptores

bloquean la formación de AMPc dependiente de la proteína quinasa A (PKA), que juega un papel importante manteniendo el estado de reposo de las plaquetas (63, 64).

Entre los GPCRs más importantes en plaquetas se encuentran los receptores para trombina y ADP. El ADP es un agonista soluble que actúa como un potente amplificador de la señal protrombótica y puede ser reconocida por P2Y₁ (acoplado a G_q) y P2Y₁₂ (acoplado a G_i) aunque la activación mediada por este ligando es más débil que la debida a otros agonistas (65).

Por otro lado, la trombina es el agonista plaquetario soluble más potente que se une a los receptores PAR-1 y PAR-4 provocando un aumento de los niveles de Ca⁺². Ambos GPCRs están acoplados a G_q/G_{12/13}, y su estimulación genera una potente activación de PLCβ (66). La trombina además de actuar como un potente agonista es responsable de la formación de fibrina a partir de fibrinógeno formando una malla que permite la estabilización del tapón hemostático.

Receptores ITAM

Otro grupo importante de receptores plaquetarios son los motivos ITAM. Las plaquetas presentan 3 tipos distintos: el complejo formado por la GPVI y la cadena γ del receptor Fc (GPVI/FcRγ), el receptor FcγRIIA, y el receptor lectina tipo C2 (CLEC-2) (67). Estos receptores están implicados en el desarrollo de ciertas respuestas fisiológicas como el mantenimiento de la hemostasia, en procesos patológicos como la

formación del trombo y en el desarrollo de metástasis en procesos cancerígenos (68).

Además, estos receptores inducen la activación plaquetaria a través de una cascada basada en tirosinas-quinasas. Una vez producido el estímulo, se produce la fosforilación de los motivos ITAM, formados por una secuencia altamente conservada (dos dominios YxxL separados por siete aminoácidos). Asimismo, se ha descrito que la vía de GPVI y la de CLEC-2 son dependientes de la liberación de los mediadores secundarios, los cuales refuerzan la señalización intracelular (69). Ambos receptores, GPVI y CLEC-2, y sus vías de señalización se encuentran descritas de forma detallada en el **apartado 1.2.2.1 y 1.2.2.2**, respectivamente.

Integrinas

Las integrinas son una familia de proteínas heterodiméricas transmembrana constituidas por dos subunidades α y β y que juegan un papel importante en adhesión y agregación plaquetaria. Las plaquetas presentan cinco tipos diferentes de integrinas ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha \text{IIb}\beta 3$ y $\alpha \text{V}\beta 3$). Así pues, dos de ellas tienen un papel relevante en la activación plaquetaria en el ámbito de la hemostasia: el receptor de colágeno $\alpha 2\beta 1$ y el receptor de fibrinógeno $\alpha \text{IIb}\beta 3$. El receptor de colágeno $\alpha 2\beta 1$ tiene como función mediar la adhesión de las plaquetas a la pared vascular, aunque tiene un papel limitado en la activación plaquetaria (70). Sin embargo, la integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$ se considera un

receptor esencial para que las plaquetas se activen y agreguen. Este receptor y su vía de señalización se detalla posteriormente en el **apartado 1.2.2.3.**

Cuando las plaquetas están en circulación, las integrinas se encuentran en un estado de reposo presentando poca afinidad por los ligandos. Una vez se produce el estímulo, éstas sufren un cambio estructural que da lugar a una conformación activa con una alta afinidad por los ligandos. Este proceso se conoce como señalización “dentro-fuera” y juega un papel muy importante en la activación plaquetaria (71).

1.2.2.1 Receptor ITAM: GPVI

El receptor GPVI es una proteína transmembrana expresada únicamente en plaquetas y megacariocitos. Se considera uno de los principales receptores de colágeno junto con la integrina $\alpha_2\beta_1$ (72).

Pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y está formada por dos dominios Ig (D1 y D2), un cuello mucilaginoso rico en sitios O-glicosilados y una cola citoplasmática con sitios de unión a calmodulina y a las SFKs (73). Tanto la expresión como señalización depende de su asociación con la cadena $\text{FcR}\gamma$, la cual contiene dos dominios ITAM (74).

Su expresión en la superficie plaquetaria puede ser en forma monomérica o dimérica. En estado de reposo el receptor se encuentra en una forma monomérica con poca afinidad a colágeno. Sin embargo,

para que se produzca la afinidad óptima con el agonista es necesario que se unan dos moléculas GPVI provocando una activación eficiente de la vía de señalización (75, 76). Se ha demostrado que los niveles de GPVI dimérico en la superficie de la membrana plaquetaria son mayores cuando la vía se encuentra activada (77). También es necesaria la formación de agrupaciones del receptor en su forma dimérica para que se produzca una activación completa de la vía (78).

En cuanto a los agonistas de GPVI, el colágeno está formado por una super hélice dextrógira formada por la asociación de tres cadenas peptídicas ricas en glicina (G), prolina (P) e hidroxiprolina (O), entre otros aminoácidos y el motivo de repetición GPO es la secuencia específica que activa GPVI (79). De hecho, existen varias moléculas que actúan a modo de agonistas exógenos, como es el caso de los CRPs (*collagen-related peptides*). Estos péptidos sintéticos imitan la estructura de triple hélice de colágeno ya que están constituidos por un motivo de repetición GPO. Estos ligando mimetizan la activación plaquetaria inducida por colágeno e inducen la agregación plaquetaria pero de manera independiente a la integrina $\alpha_2\beta_1$ (80).

Además, se ha postulado que dicho receptor podría tener afinidad por otros ligandos además del colágeno como la adiponectina, laminina, fibronectina y vitronectina (81, 82). Uno de los descubrimientos más recientes de los últimos años es la interacción de GPVI con fibrina (o fibrinógeno) (83). La unión de receptor-ligando desencadena la activación plaquetaria dando lugar a la exposición de

fosfatidilserina (PS) en la superficie de la membrana y la generación de trombina. Sin embargo, aunque se acepta que fibrina sea un ligando de GPVI, diferentes grupos discrepan en si su unión se produce con la forma monomérica o la forma dimérica del receptor (84-86).

Vía de Señalización

La señalización intracelular a través de GPVI comienza con la fosforilación del motivo ITAM de la cadena FcR mediada por la SFKs presentes en las balsas lipídicas (**Figura 5**). GPVI contiene un dominio rico en prolina (PxxP) que presenta afinidad por el dominio SH3 de SFK Lyn (87). Tras la fosforilación del dominio ITAM, la tirosina-quinasa Syk se une a la secuencia YxxL y desencadena la cascada de señalización aguas abajo del receptor. En las primeras etapas de la vía, la activación de Syk permite la fosforilación de la proteína adaptadora LAT. Una vez fosforilada, LAT recluta diferentes proteínas como las proteínas adaptadoras Gads y Grb2 gracias a sus dominios SH2 y también recluta SLP-76 dado que está constitutivamente asociadas a ellas (88, 89). Por último, PLC γ 2 se une al complejo produciendo calcio intracelular y DAG.

Se ha descrito que existen otras proteínas que también intervienen en la vía de señalización como las tirosina-quinzas Btk y Tec; la proteína G Rac1; los factores intercambiadores de GTP Vav1 y Vav3; la proteína de ubiquitinación c-Cbl. De hecho, inhibiendo todas

ellas se observa una disminución de agregación a consecuencia de una disminución de la fosforilación de PLC γ 2 (90).

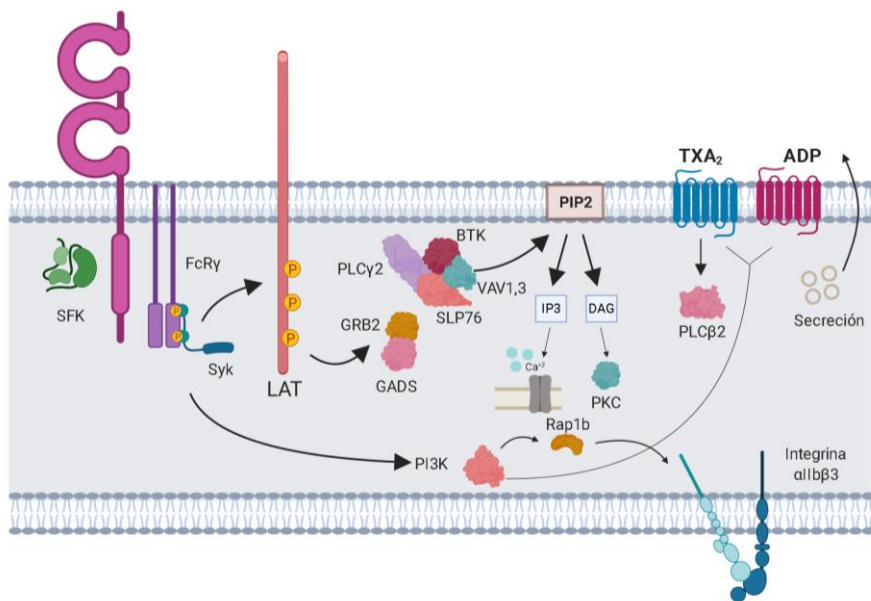


Figura 5: Vía de señalización del receptor de colágeno GPVI

Una vez activada la vía de señalización de GPVI, se produce la liberación del dominio extracelular conocido como GPVIs al torrente sanguíneo, dejando expuesto el resto de la proteína (aproximadamente 10 kDa) en la superficie de la plaqueta. Esta escisión está mediada por la acción de las MMP, especialmente ADAM10 y ADAM17. Recientemente los investigadores del campo han propuesto GPVIs como un potente biomarcador específico de activación plaquetaria (91).

1.2.2.2 Receptor ITAM: CLEC-2

El receptor CLEC-2 es una proteína de membrana tipo II con un dominio extracelular similar al de reconocimiento de carbohidratos expresado en otras lectinas tipo C, pero que carece de los aminoácidos conservados que confieren esta capacidad para unirse a azúcares (92).

Esta proteína se identificó por primera vez en un análisis bioinformático de cribado para la identificación de receptores tipo lectina C en células mieloides (93). Sin embargo, no fue hasta el año 2006 cuando se describió su papel como receptor plaquetario. Suzuki-Inoue y colaboradores identificaron CLEC-2 como el receptor plaquetario de *rhodocytin*, proteína extraída de un veneno de serpiente (94).

CLEC-2 se expresa mayoritariamente en plaquetas y megacariocitos, aunque también se han encontrado en otras células tales como células hepáticas (células de Kupffer y células endoteliales sinusoidales), células dendríticas, células *Natural Killer*, monocitos y granulocitos (93, 95).

El receptor CLEC-2 expresa un motivo hemITAM (definido por una única secuencia YxxL) en su dominio citoplasmático. Dado las características de este receptor, es necesaria la dimerización del mismo para que se produzca una activación eficiente de la vía, y así desencadenar los eventos de señalización intracelular (96).

Entre los principales agonistas de CLEC-2 se encuentran *rhodocytin* y la proteína endógena podoplanina. Podoplanina es una

glicoproteína transmembrana tipo sialomucina expresada en células endoteliales linfáticas, podocitos, células alveolares tipo 1 y ciertos tipos de células tumorales (68, 97). No obstante, esta proteína parece no tener ningún papel en la hemostasia, lo que refuerza la hipótesis de que podría existir otro agonista de CLEC-2, cuya interacción con el receptor jugaría un papel relevante en la formación del trombo.

Vía de Señalización

Durante los primeros años de investigación de CLEC-2, se creía que ambas vías de señalización mediadas por motivos ITAM (GPVI y CLEC-2) eran muy similares. Sin embargo, diversos estudios han ido mostrando diferencias entre ellas, como por ejemplo la propia vía de señalización hemiITAM, el papel de algunas de las proteínas involucradas en la vía de señalización y papel de los mediadores secundarios (98).

Una vez se produce la interacción receptor-ligando mediante el dominio extracelular, la tirosina-quinasa Syk se recluta a nivel de la secuencia YxxL del dominio citoplasmático del receptor (**Figura 6**). El receptor se debe encontrar en forma dimérica para que se produzca la activación de la vía de señalización (96). El mecanismo por el cual Syk se activa e interacciona con el receptor todavía no está claro, pero se cree que su estimulación podría ser dependiente de SFKs (99), o incluso de PI3K y quinasas de la familia Tec (100). Una vez Syk interacciona con los dominios hemITAM, esta induce la fosforilación de los mismos

(96, 99), iniciando así la cascada de señalización. Posteriormente, se produce la unión de Syk a la proteína adaptadora LAT que da lugar a la cascada de señalización de la vía y que acabará con activación de proteínas tales como Btk, SLP-76, PLC γ 2, quinasas Tec y PI3K (67).

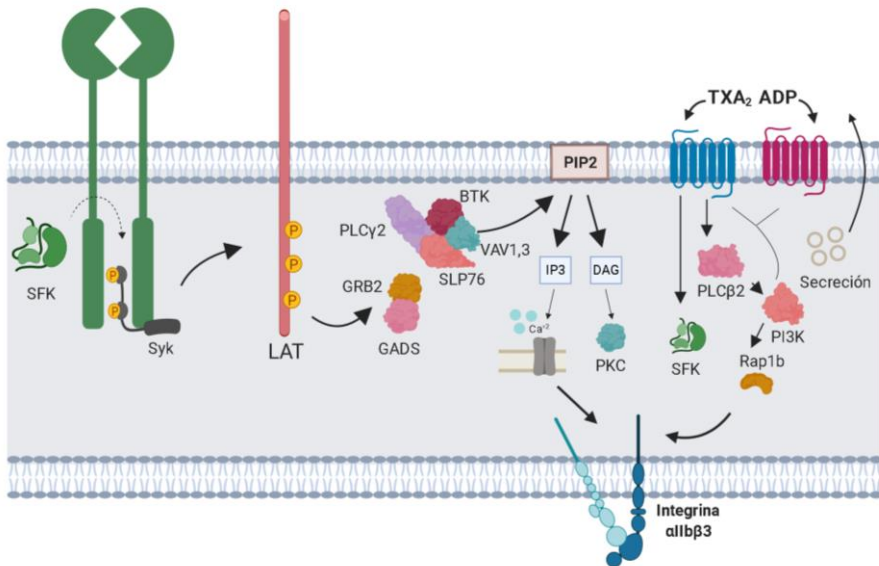


Figura 6: Vía de señalización del receptor de colágeno GPVI

1.2.2.3 Integrinas: Integrina α IIb β 3

Las integrinas juegan un papel crucial en la adhesión y la agregación plaquetaria. El receptor más abundante e importante de esta familia es la integrina α IIb β 3 que sirve como receptor para fibrinógeno, FvW, vitronectina y otras proteínas de la matriz que ayudan a la agregación plaquetaria y a la adhesión estable de las mismas.

La integrina está formada por dos cadenas (α y β) en la región extracelular, una región transmembrana y una cola citoplasmática. De hecho, las plaquetas en circulación presentan la integrina en un estado de reposo con poca afinidad por los ligandos. Una vez ocurre la estimulación con el agonista, se produce un cambio conformacional donde se separan las dos cadenas y provoca que el receptor se encuentre en un estado activo y de alta afinidad (101). La integrina presenta dos tipos de vías de señalización “dentro-fuera” y “fuera-dentro” (**Figura 7**).

Se ha demostrado que el agrupamiento del receptor es necesario para promover la interacción proteína-proteína. Además, esa agrupación permite desencadenar la activación máxima de la vía de señalización cosa que no ocurre con otros receptores (102).

Vía de Señalización “dentro-fuera”

Como se ha citado anteriormente, las integrinas se encuentran en un estado de reposo con poca afinidad por los ligandos. Después de ocurrir el estímulo, ésta cambia de conformación y pasa a un estado de activación. Este proceso se conoce como la señalización “dentro-fuera”. El estímulo suele venir dado por otros receptores plaquetarios como los receptores PAR y las glicoproteínas GPVI y GPIb-IX-V.

Cuando se une el ligando a esos receptores, se desencadena la cascada de señalización que permitirá al cambio de conformación de la integrina. Todo este proceso viene acompañado con la unión de la talina

y kindlin al dominio citoplasmático $\beta 3$ que permitirá el cierre del receptor y su posterior activación (71).

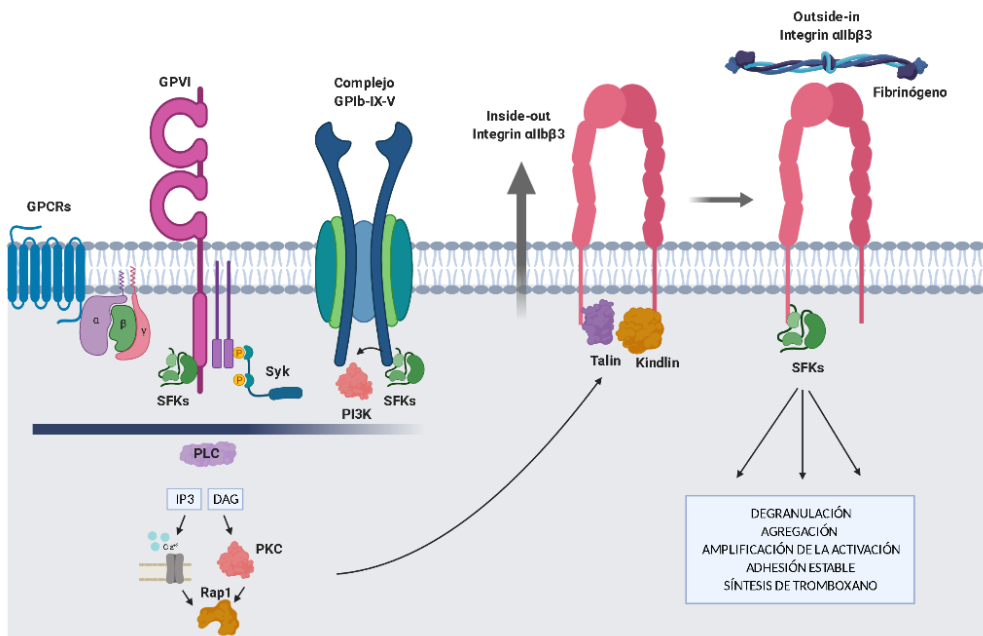


Figura 7: Vía de señalización del receptor de fibrinógeno: integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$

Vía de Señalización “fuera-dentro”

La unión ligando-integrina no solo media la agregación y adhesión plaquetaria sino que también permite la transducción de señales que dará lugar a la activación de diferentes vías de señalización y a la reorganización del citoesqueleto (103). Este proceso se conoce como la señalización *outside-in* (“fuera-dentro”) y conduce a una serie de respuestas celulares como el cambio de forma de las plaquetas y la

desgranulación. Estas respuestas ayudan a amplificar la agregación plaquetaria y por tanto al aumento del trombo.

Diferentes tirosinas quinasas como Syk y SFKs participan en la señalización vía “fuera-dentro”. Recientemente se ha demostrado la importancia de Src en las primeras etapas de la vía. De hecho, Src se une al motivo RGT de la integrina induciendo la activación de PI3K, la activación de ITAM dependiente de Syk y la desgranulación plaquetaria (104).

1.2.3 Degranulación plaquetaria

La secreción plaquetaria juega un papel crucial en muchos aspectos fisiopatológicos como la inflamación, la trombosis y la angiogénesis. Se sabe que la secreción de plaquetas es heterogénea y la liberación de su contenido permite modular los microambientes donde ellas se encuentran activadas.

1.2.3.1 Gránulos densos, gránulos α y lisosomas

Los gránulos procedentes de las plaquetas fueron descritos a finales del siglo XIX, pero no fue hasta 1966 cuando fueron capaces de distinguirlos entre ellos (105). Las plaquetas contienen tres grandes grupos de gránulos: gránulos α , gránulos densos, lisosomas.

Los gránulos α son los más abundantes y son exclusivos de plaquetas conteniendo alrededor de 50-80 por célula. Contienen una gran cantidad de proteínas entre las cuales se encuentran receptores de

membrana asociados (integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y P-selectin) y proteínas solubles (PF4 y fibrinógeno). Los gránulos α están involucrados en diferentes procesos como adhesión celular, coagulación, inflamación y crecimiento celular.

Los **gránulos densos** son los segundos más abundantes entre 3-8 por plaqueta. Contienen una gran cantidad de moléculas como ATP, ADP, fosfatasa, potasio y calcio intracelular, además de moléculas bioactivas como serotonina e histamina (106).

El tercer grupo lo componen los **lisosomas** y hay entre 1-3 por plaqueta. Contienen principalmente enzimas que degradan proteínas como catepsinas, elastasa y colagenasas. Su función específica todavía no se conoce con claridad (107).

1.2.3.2 Vesículas extracelulares

A parte de la vía clásica de secreción, las plaquetas también pueden liberar otro tipo de vesículas como es el caso de las vesículas extracelulares (VEs) que carecen de una secuencia señal que las dirija.

Fue en 1967 cuando Peter Wolf descubrió por primera vez las VEs en el plasma, a las cuales llamó “polvo plaquetario” (108). Las VEs, procedentes de distintos tipos celulares liberadas tras un estímulo, se encuentran presentes en la mayoría de los fluidos biológicos (109).

Las VEs se definen como un grupo de vesículas compuestas por una bicapa lipídica que contiene un gran repertorio de moléculas como proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos. Durante los últimos años, el

interés de estas vesículas ha crecido de forma exponencial dada su relación directa con la comunicación célula-célula, la activación celular, la inflamación y la hemostasis (110, 111). De hecho, se han postulado como dianas terapéuticas prometedoras y como fuente de biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de diferentes patologías.

A partir de su descubrimiento, las VEs recibieron diferentes nombres por lo que fue necesario establecer una nomenclatura universal. Actualmente, las VEs se dividen en tres grandes grupos en función de su origen y tamaño: microvesículas (MVs), exosomas y cuerpos apoptóticos (112).

Las MVs tienen un tamaño de 100-1.000 nM y se liberan por gemación de la membrana plasmática, y se inducen por apoptosis o activación plaquetaria. Los exosomas (30-100 nM) son más pequeños y son generados en los denominados cuerpos multivesiculares donde pueden ser almacenados en el citoplasma y más tarde en respuesta a diferentes estímulos ser liberados. Los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática para liberar su contenido (los exosomas) al medio extracelular (113). Por último, los cuerpos apoptóticos (500-4.000 nM) se forman a consecuencia de la iniciación de la apoptosis celular (114, 115) (**Figura 8**).

VEs derivadas de plaquetas

Tal y como se menciona anteriormente, Peter Wolf descubrió por primera vez las VEs las cuales denominó “polvo plaquetario”(108). De hecho, el 70-90% de las VEs circulantes presente en el plasma de individuos sanos provienen de plaquetas (116).

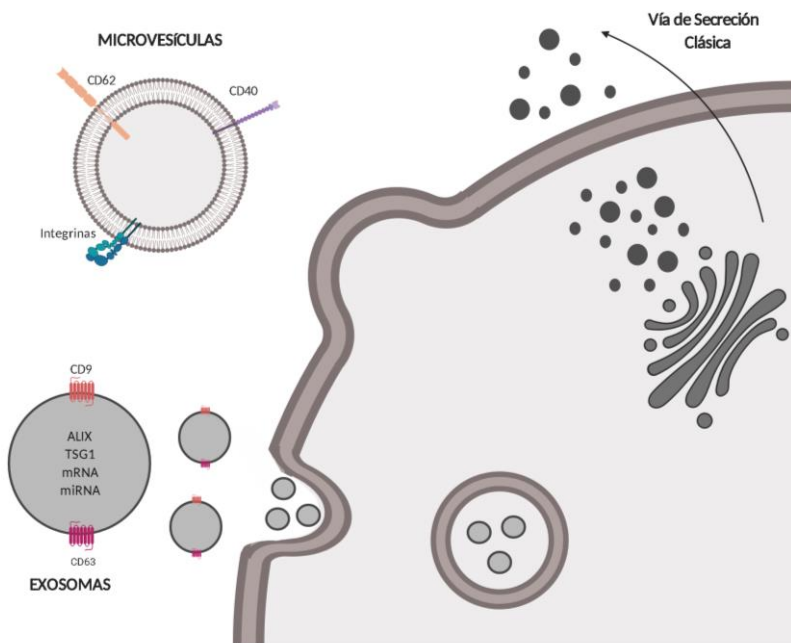


Figura 8: Vía de secreción a través de VEs

Las MVs de plaquetas o también conocidas como micropartículas (MPs) expresan una gran variedad receptores como es el caso de CD41 y glicoproteínas. Las MPs pueden actuar como agentes procoagulantes contribuyendo así a la iniciación y progresión de

enfermedades cardiovasculares, promoviendo la activación de los leucocitos y la agregación plaquetaria (117, 118).

No obstante, estudios recientes sugieren el papel protector de los exosomas derivados de plaquetas durante el proceso de aterosclerosis (119).

Por todos estos motivos, el uso de VEs como fuente de biomarcadores podría ser una herramienta útil en la práctica clínica como potenciales predictores de enfermedades cardiovasculares.

1.1.3 Obesidad y función plaquetaria

Desde un punto de vista de investigación plaquetaria, el interés por estudiar la posible correlación que existe entre la obesidad y la enfermedad coronaria ha crecido exponencialmente durante los últimos años. Diferentes grupos de investigación se han centrado en estudiar el papel patológico que presentan las plaquetas en ese tipo de pacientes: anomalías en los parámetros plaquetarios, hiperactivación plaquetaria y como consecuencia de ella la activación, la liberación de VEs y una menor respuesta a fármacos antiagregantes (120-124) (**Figura 9**).

1.1.3.1 Anomalías plaquetarias

Los pacientes obesos poseen una serie de alteraciones en los parámetros plaquetarios causados por esa cierta hiperreactividad que les caracteriza. El tamaño y el volumen de las plaquetas son dos medidas importantes relacionadas con la función plaquetaria. En la clínica, el

volumen plaquetario medio (VPM) es considerado un indicador de activación y recientemente un importante factor de riesgo aterotrombótico.

Se ha demostrado que el VPM aumenta cuando las plaquetas se activan, dando lugar a que esas plaquetas “grandes” tengan más tendencia a adherirse y a agregar (125). Este parámetro se ha encontrado aumentado en otro tipo de enfermedades como infarto agudo de miocardio y otras enfermedades de riesgo cardiovascular como diabetes, hipertensión e hipercolesterolemia (126-128).

Actualmente, existe bastante discrepancia entre los estudios que relacionan el VPM y la obesidad. En la literatura, algunos grupos de investigación apuntan a que existe un aumento del VPM en los pacientes obesos correlacionando positivamente con el IMC y la circunferencia de la cintura (129-131). Asimismo, la pérdida de peso también se ha visto asociada a una disminución del VPM (132). Sin embargo, otros grupos destacan que no existe una relación directa entre el VPM y IMC (133-135), ni una disminución de los niveles de VPM tras cirugía bariátrica (136).

El conteo plaquetario (PLT) es otro parámetro directamente relacionado con el aumento del riesgo cardiovascular. En la bibliografía, se ha asociado de manera directa el PLT con el IMC, la circunferencia de la cintura y el porcentaje total de grasa, apuntado a una correlación positiva entre la cantidad de plaquetas y la distribución

de grasa corporal (135). Además, se han visto disminuidos estos niveles en pacientes después de una cirugía bariátrica (136, 137).

Estado Proinflamatorio

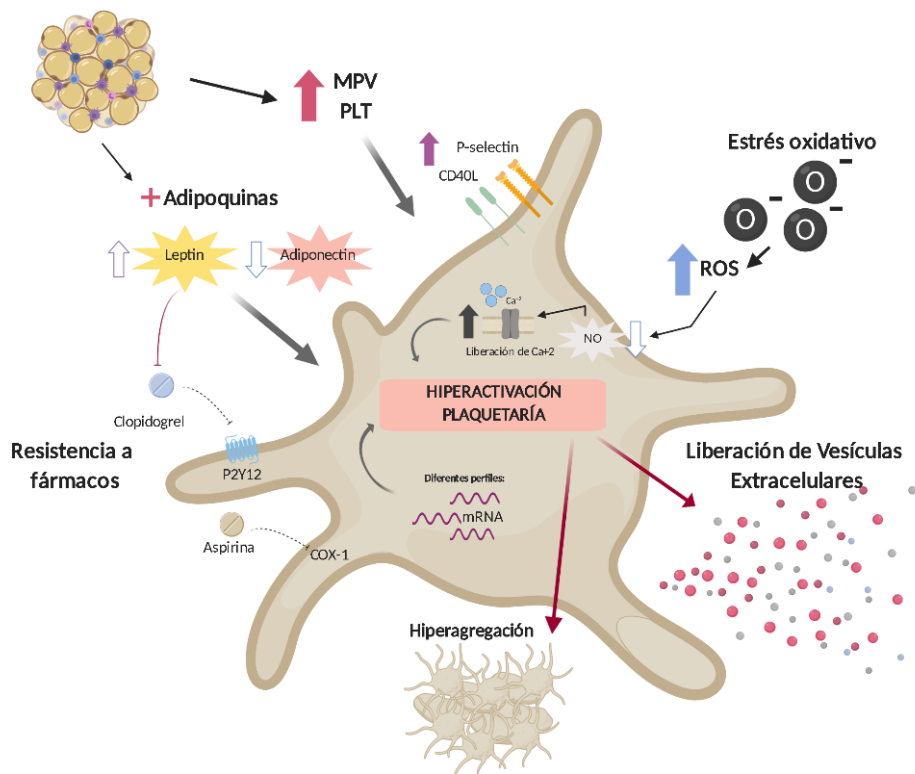


Figura 9: Afectación de la función plaquetaria en pacientes obesos

Otros marcadores de activación plaquetaria como P-selectin (138-140) y CD40L (141, 142) también se han visto aumentados en pacientes obesos. Tanto P-selectin como CD40L están presentes en los gránulos α y se translocan a la superficie de las plaquetas tras su

activación. En el caso de CD40L, se ha descrito que una vez en la superficie de la membrana, éste se parte y se libera al plasma en forma de fragmento soluble. Ambos marcadores se pueden medir en la superficie de la membrana plaquetaria o en el plasma como proteínas solubles.

En resumen, los pacientes obesos presentan un aumento en los marcadores de activación plaquetaria apuntando a la confirmación de ese estado hiperreactivo de las plaquetas obesas y su asociación a un mayor riesgo cardiovascular.

1.1.3.2 Hiperactivación plaquetaria

La hiperactivación plaquetaria presente en los pacientes obesos juega un papel decisivo en la patología aterotrombótica (120). Entre las posibles causas de esta alteración podemos encontrar: alteración de la señalización plaquetaria, mayores niveles de receptores plaquetarios, menor fluidez en la membrana, y un aumento del estrés oxidativo.

El interés por conocer y explicar el estado hiperreactivo de las plaquetas en la patología de la obesidad ha hecho que diferentes grupos de investigación las estudien en profundidad. Recientemente, se ha demostrado que las plaquetas de los pacientes obesos en un estado basal presentan diferentes patrones a nivel de ácido ribonucleico (ARN) mensajero (ARNm). El primer estudio compara perfiles de ARNm en plaquetas de pacientes obesos frente a sus controles macheados por edad y sexo. De hecho, más de 600 transcritos varían entre ambos

grupos, entre los aumentados se encuentra CLEC-2, principal receptor de las vías de señalización mediadas por ITAM. Además, dentro del estudio también se investiga el perfil de ARNm de los pacientes obesos tras haber sufrido cirugía bariátrica. Los resultados apuntan a que existe una reducción en la activación plaquetaria tras la cirugía y que ésta viene dada por una alteración del transcriptoma (143).

Durante los últimos años se han investigado las plaquetas de pacientes obesos de una manera más mecanística. Para ello y por medio de citometría de flujo (CMF), se han medido los niveles de diferentes receptores en la superficie de las plaquetas, todos ellos relacionados con activación plaquetaria. Estudios demuestran que los pacientes obesos presentan niveles más altos de P-selectin y CD40 (143).

La alteración de receptores a nivel de superficie de membrana como el caso de P-selectin y CD40 podría ser uno de los mecanismos por los cuales se postula que los pacientes obesos presentan un estado pro-agregante basal comparado con los individuos delgados. Según la bibliografía, se ha demostrado que las plaquetas de pacientes obesos presentan una mayor agregación en respuesta a diferentes agonistas como el colágeno, ADP y ácido araquidónico (AA) (123, 144). De igual manera, la hiperagregación plaquetaria en respuesta a ADP también se ha visto aumentada en varios modelos animales con obesidad inducida (145, 146). No obstante, un estudio reciente dirigido por Elaïb y colaboradores señala que los pacientes obesos agregan menos en respuesta a trombina (147).

La fluidez de la membrana plasmática es otro factor crítico en la agregación y secreción plaquetaria. El grupo de Raffaelli y colaboradores estudió la fluidez de la membrana plaquetaria en pacientes obesos. Los resultados que obtuvieron fueron que las plaquetas de pacientes obesos presentan una disminución en la bomba de sodio/potasio y en la fluidez de la membrana apuntando directamente a una correlación con la patogénesis de la aterosclerosis (148).

El estrés oxidativo también ha sido asociado directamente con la obesidad y la hiperactivación plaquetaria. Está considerado como un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las moléculas antioxidantes. Estudios recientes determinan que los pacientes obesos muestran unos niveles de ROS más elevados comparados con los controles delgados (123, 149). De hecho, se ha demostrado que los pacientes obesos presentan estrés oxidativo en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) lo que da lugar a una activación plaquetaria (150).

El ON juega un papel principal controlando la hemostasia y manteniendo el estado basal de las plaquetas. De hecho, el ON disminuye los niveles de liberación de calcio intracelular, inhibe los receptores de tromboxano en plaquetas y disminuye la formación del trombo (151). En condiciones normales, la activación plaquetaria es inhibida con el aumento de ON y PGI_2 lo que da lugar a un incremento en los niveles de GMPc y AMPc solubles, respectivamente. Estos niveles desencadenan una cascada de fosforilación de quinasas

dependientes de GMPc dando lugar a una menor liberación de calcio intracelular, bloqueando la desgranulación, la adhesión y la agregación plaquetaria (152).

En este contexto, la producción excesiva de ROS hace que disminuya la disponibilidad de ON favoreciendo su propia activación. En obesidad, se ha demostrado que los pacientes obesos tienen menor respuesta a NO y PGI₂ lo que da lugar a una reducción de los niveles de GMPc y AMPc y por tanto una susceptibilidad a la activación plaquetaria (153, 154).

A modo de resumen, los estudios previamente descritos sugieren que los pacientes obesos presentan una serie de características que podrían contribuir a una alteración plaquetaria aumentando así el riesgo cardiovascular. Sin embargo, futuros estudios serán necesarios para poder esclarecer las principales causas por las que las plaquetas obesas presentan un perfil distinto al de las plaquetas de controles delgados

1.1.3.3 Liberación de VEs

La obesidad también tiene un impacto en la liberación de VEs presentes en el plasma. De hecho, los pacientes obesos presentan niveles de VEs circulantes superiores (10 veces más) si se compara con las VEs circulantes de los individuos delgados (111). Estos niveles elevados se correlacionan con un aumento del IMC, la circunferencia de la cintura y la distribución de grasa corporal (155-157). Asimismo y en línea con

los resultados en humano, se observó que un modelo de rata obesa también presentaba niveles de EVs circulantes superiores si se comparaba con el grupo control (158).

Dentro de las VEs, los pacientes obesos presentan dos subpoblaciones mayoritarias: exosomas (20%) y MVs (80%). Sin embargo, no está del todo claro que el aumento de estas vesículas venga dado por el incremento de una de las poblaciones o de ambas. Por otro lado, la reducción de peso también genera una disminución de dichas vesículas (155, 157). Recientemente, se ha demostrado que los pacientes con obesidad presentan diferentes perfiles en el cargo de las VEs, como es el caso del perfil de microARN (miARN). De hecho, en las VEs de los pacientes obesos identificaron 8 miRNA relacionados con el IMC (ej. let-7b, miR-146a) y glucemia (miR-222/223, miR-26b)(159).

A modo de resumen y desde un punto de vista clínico, el uso de las VEs procedentes del plasma podría ser una herramienta útil como fuente de biomarcadores para la diagnosis de enfermedades asociadas a la obesidad como las ECV.

1.1.3.4 Respuesta a fármacos antiagregantes

A pesar de que existen evidencias clínicas que respaldan la eficacia y la seguridad de la aspirina y/o del clopidogrel como fármaco antitrombótico, existen ciertas cuestiones que ponen en duda su efecto en pacientes obesos. Durante los últimos años, diferentes observaciones

farmacodinámicas en estudios clínicos demuestran que los pacientes obesos presentan una mayor reactividad plaquetaria y por tanto menor respuesta a fármacos antiagregantes.

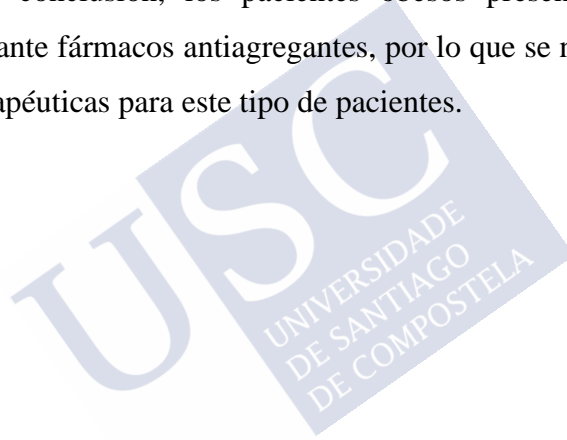
En el caso de la aspirina, el grupo de Bordeaux y colaboradores evaluó el impacto de la obesidad en la respuesta a dicho fármaco. El estudio mostró que los pacientes obesos presentaban una menor respuesta al fármaco antiagregante, lo que daba lugar a una mayor actividad plaquetaria en los obesos tras suministrarle la aspirina (144).

A parte de la aspirina, existen otros fármacos de la familia de las tienopiridinas que inhiben el receptor de ADP, P2Y₁₂ como es el caso del clopidogrel. Éste puede administrarse solo o en combinación con otros fármacos como prevención de eventos aterotrombóticos. La relación entre el IMC y la eficacia del clopidogrel es tema de debate actualmente. De hecho, existen evidencias que respaldan una disminución de la respuesta frente al clopidogrel en pacientes obesos (160-162). Sin embargo, estudios recientes han descrito que no existen diferencias claras en la eficacia si se tratan a los pacientes obesos con dicho fármaco (163). Asimismo, también se ha relacionado la resistencia de clopidogrel con la obesidad, postulando que los obesos al presentar niveles más altos de leptina en suero dan lugar a un aumento a la resistencia del fármaco (164).

Por último, el prasugrel también se encuentra en la familia de las tienopiridinas. En el estudio que se describe a continuación se compararon los dos inhibidores de P2Y₁₂, clopidogrel (fármaco de

segunda generación) y prasugrel (fármaco de tercera generación) en pacientes obesos. Según los resultados del estudio, Darlington y colaboradores confirmaron que el prasugrel consigue mejores efectos farmacodinámicos en los pacientes obesos cuando los comparas con individuos delgados. Estos resultados determinan que las tienopiridinas de tercera generación, como es el caso del prasugrel, muestran mejores resultados antiagregantes para dicho grupo de pacientes (165).

En conclusión, los pacientes obesos presentan una menor respuesta ante fármacos antiagregantes, por lo que se necesitan nuevas dianas terapéuticas para este tipo de pacientes.





2. OBJETIVOS



Los objetivos generales planteados en la presente tesis doctoral son:

1. Estudiar las plaquetas de pacientes obesos con el fin de identificar posibles dianas terapéuticas y biomarcadores de riesgo aterotrombótico en obesidad.
2. Estudiar las vesículas extracelulares circulantes de dichos pacientes como fuente de biomarcadores de riesgo cardiovascular en obesidad.

De estos objetivos generales se derivan los siguientes específicos:

1. Estudiar los niveles de activación plaquetaria asociadas a las diferentes vías de señalización, profundizando en los mecanismos asociados a la hiperactivación plaquetaria en obesidad.
2. Estudiar los lípidos de las plaquetas en pacientes obesos con el fin de ver alteraciones plaquetarias en obesidad.
3. Establecer un modelo de rata obesa inducida por dieta como modelo animal para estudiar de manera funcional y bioquímica las plaquetas en obesidad.
4. Estudiar los cambios en el proteoma de las VEs de pacientes obesos con vistas a obtener un panel de biomarcadores de riesgo aterotrombótico.



3. MATERIAL Y MÉTODOS



La composición de todos los equipos, reactivos y tampones utilizados durante la presente tesis doctoral se encuentra recogida en el **Anexo I** y **Anexo II**.

3.1 SELECCIÓN Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Los estudios se realizaron con muestras de pacientes que fueron seleccionados dependiendo del IMC: 50 pacientes diagnosticados con obesidad mórbida ($IMC > 40$) y 47 donantes delgados ($18 < IMC < 25$). El estudio está aprobado por el Comité de Ética de la investigación de Galicia (Código de registro 2009/270) y se llevó a cabo en base a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki. Este trabajo con pacientes se desarrolló bajo la línea de investigación “Identificación de biomarcadores plaquetarios en enfermedades cardiovasculares mediante proteómica clínica”. Antes de la extracción de muestra, todos los pacientes/donantes firmaron un consentimiento informado donde se detallaba el objetivo principal del estudio el cual se encuentra reflejado en el **Anexo III**.

La **Tabla 2** recoge las distintas cohortes utilizadas en los estudios realizados en la presente tesis.

La muestra de sangre se obtuvo por punción de la vena cubital con una aguja de calibre 21G en tubos Vacuette® de 4,5 mL con un 3,5% de citrato sódico (anticoagulante). Según los requerimientos del estudio, se recogieron entre 30 y 36 mL de sangre por individuo. En paralelo, se recogieron los datos bioquímicos y antropométricos, que se

recogen de rutina en la consulta de obesidad, de ambos grupos de pacientes.

Tabla 2: Número de individuos que se utilizaron en los estudios de la presente tesis.

ESTUDIO		COHORTE DE PACIENTES		
		CONTROLES	OBESOS	Pools
Estudio de las plaquetas	Proteómico (2D-DIGE)	10	10	X
	Fosfoproteómica	12	12	
	Funcionales	47	50	
Estudio de los lípidos de la membrana plaquetaria		9	9	
Estudio de las VEs	Proteómico (2D-DIGE)	10	10	X
	LC-MS/MS	12	12	
	Validaciones	5	5	

3.1.1 Pacientes con obesidad mórbida

Las muestras de pacientes con obesidad mórbida ($IMC \geq 40$) fueron recogidas en la consulta de obesidad con la colaboración del Dr. Martis Sueiro del *Servizo de Endocrinoloxía* de la *Xerencia de Xestión Integrada* de Santiago de Compostela. Los principales criterios de exclusión fueron los siguientes: desordenes de coagulación, enfermedades asociadas a plaquetas, medicación crónica antitrombótica y/o de enfermedades crónicas (excepto aquellos fármacos que no afectaran a la reactividad plaquetaria).

3.1.2 Donantes delgados

En el caso de los controles delgados sanos, fueron voluntarios que se prestaron a donar sangre para el estudio. Se seleccionaron aquellos que no presentaban diferencias significativas respecto al grupo de pacientes con obesidad mórbida en género y edad. El principal criterio de exclusión fue la toma de medicación antiagregante plaquetaria en los 7 días previos a la extracción y no padecer ninguna enfermedad crónica que pudiera alterar la reactividad plaquetaria.

3.2 AISLAMIENTO DE PLAQUETAS

Las plaquetas fueron aisladas en base a un protocolo estandarizado de centrifugaciones seriadas, limitando así la contaminación de las mismas con otras células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos). Además, este protocolo minimiza la posibilidad de una activación espontánea debida al procedimiento empleado. Las muestras fueron procesadas durante la primera hora después de su extracción, para evitar alteraciones a nivel bioquímico y proteómico (166). El protocolo se detalla a continuación:

- Se precalienta 50 mL de MTB (*Modified Tyrode's buffer*) a 30°C, suplementado previamente con 5 mM de glucosa y 10 mL de ACD (ácido-citrato-dextrosa).
- Posteriormente, a cada tubo se le añade un 10% de ACD (v/v) a cada tubo de sangre. Se mezcla la muestra invirtiendo suavemente el tubo unas tres veces. Se cambian los tapones y se

elimina los posibles restos de sangre que se encuentren en la pared del tubo evitando así contaminaciones posteriores.

- La muestra se centrifuga durante 20 min a 200g en una centrifuga hematológica (Eppendorf 5702 R). Todas las centrifugaciones fueron sin freno para evitar cambios bruscos en la velocidad del rotor que pudieran alterar la muestra. Tras la primera centrifugación, se cogen las tres cuartas partes de la fase superior de la muestra, plasma rico en plaquetas (PRP), evitando el contacto con la fase roja (eritrocitos) y con la interfase (leucocitos).
- Una vez recogido el PRP se juntan en un mismo tubo y se somete a una nueva centrifugación, esta vez a 1.000g durante 10 minutos (min), en presencia de prostaglandina I₂ (PGI₂, concentración final 1 μ M), un inhibidor de la activación plaquetaria. Tras la segunda centrifugación se obtiene el *pellet* de plaquetas. El sobrenadante o plasma pobre en plaquetas (PPP) se separa con el fin de obtener posteriormente las vesículas extracelulares (**apartado 3.4**).
- Al *pellet* de plaquetas se le añade 150 μ L de ACD y 1 mL de MTB, ambos precalentados, y se mezcla suavemente con la pipeta hasta deshacerlo. Una vez resuspendido, se incrementa el volumen hasta 25 mL de MTB y se añaden 3 mL de ACD.
- Se procede al conteo de las plaquetas: para ello se diluyen 5 μ L de la suspensión de plaquetas en 10 mL de Isoton II (Beckman

Coulter, Brea, CA, EEUU) y se introduce en el Z1 Coulter Particle Counter. El conteo se realiza por duplicado. Este equipo está programado para contar aquellas partículas que se encuentren entre 1,785 y 3,855 μM de tamaño. Además, también se considera el número de partículas superior al límite de tamaño (3,855 μM) ya que corresponde a la contaminación de la muestra con otros tipos celulares.

- Tras el conteo, las plaquetas se someten a una nueva centrifugación de 1.000g durante 10 min, en presencia de PGI_2 (concentración final 1 μM). Una vez se obtiene el *pellet*, las plaquetas se resuspenden en MTB a la concentración deseada para cada estudio.
- Las muestras deben permanecer en reposo a temperatura ambiente al menos durante 30 min tras su aislamiento.
- Posteriormente, las plaquetas se utilizaron para estudios funcionales y/o fueron lisadas con los tampones descritos en la **Tabla 3** dependiendo del estudio que se fuera a realizar.

3.2.1 Obtención de PRP

En el aislamiento de PRP para estudios funcionales la muestra no se trata con ACD, ya que es un quelante de calcio intracelular y podría interferir en los resultados. Una vez extraída la sangre, los tubos se invierte 3 veces con suavidad para que el anticoagulante se mezcle bien con la muestra. Posteriormente, se cambian los tapones y se elimina los

restos de sangre de la pared del tubo. Una vez limpios, se centrifuga a 200g durante 20 min y se recogen las 3/4 partes de la fase superior de la muestra evitando el contacto con las otras fases (fase roja e interfase). El PRP se transfiere a un tubo nuevo para su posterior uso en ensayos funcionales de agregación plaquetaria (**apartado 3.3.1**).

Tabla 3: Concentraciones de plaquetas utilizadas en los diferentes estudios.

ENSAYO	CONCENTRACIÓN	MÉTODO DE LISIS
Agregación plaquetaria	$2,5 \times 10^8$ plaquetas/mL	-
Citometría de flujo	5×10^7 plaquetas/mL	-
Adhesión plaquetaria	1×10^8 plaquetas/mL	-
Proteómica	8×10^8 plaquetas/mL	Tampón de Lisis (NP-40) o SDS 2%
Lipidómica	$2,5 \times 10^8$ plaquetas totales	Nitrógeno Líquido
Inmunoprecipitación	8×10^8 plaquetas/mL	Tampón de Lisis

3.3 ESTUDIOS FUNCIONALES CON PLAQUETAS

3.3.1 Ensayos de agregación

Los ensayos de agregación sirven para evaluar la respuesta plaquetaria frente a diferentes estímulos, en nuestro caso agonistas de las principales vías plaquetarias. El objetivo de esta técnica es poder determinar qué vías de señalización podrían estar alteradas en pacientes con obesidad mórbida frente a controles delgados. Para ello, se evalúan dos condiciones: una condición más fisiológica (PRP) donde se partió de un volumen constante de PRP (300 μ L) y una condición más

“limpia” donde las plaquetas están resuspendidas en MTB (plaquetas lavadas) a una concentración de $2,5 \times 10^8$ plaquetas/mL. Los ensayos de agregación se llevaron a cabo en un agregómetro Chrono-Log-490-X. Las concentraciones de los agonistas utilizados se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 4: Agonistas utilizados en ensayos de agregación plaquetaria.

PRP	AGONISTA	Cf	COHORTE	Plaquetas lavadas	AGONISTA	Cf	COHORTE
	CRP-XL	0,1 µg/mL	18		CRP-XL	0,4 µg/mL	20
		0,15 µg/mL	20			0,5 µg/mL	20
		0,2 µg/mL	18			1 µg/mL	20
	Colágeno Horm	0,5 µg/mL	20		Colágeno Horm	1 µg/mL	20
		0,75 µg/mL	20			2 µg/mL	19
		1 µg/mL	17			3 µg/mL	19
	<i>Rhodocytin</i>	25 nM	20		<i>Rhodocytin</i>	25 nM	20
		50 nM	20			50 nM	20
	ADP	2 µM	11			100 nM	18
		3 µM	8		Trombina	0,5 U/mL	14
	AA	0,3 mM	9			0,75 U/mL	20
		0,5 mM	5				

Cf= concentración final

El protocolo detallado es el siguiente:

- Se añaden 300 µL de PRP o plaquetas lavadas ($2,5 \times 10^8$ plaquetas/mL) en una cubeta Chrono-Log 312. Se incuban las

plaquetas durante 4 min sin agitación (37°C) y pasado ese tiempo durante 1 min con agitación constante (1200 rpm) en el agregómetro.

- Transcurrido el minuto las muestras se estimulan con un agonista a la concentración deseada y se registra su efecto durante 5 min, manteniendo las condiciones de agitación y temperaturas mencionadas anteriormente.

3.3.2 Ensayos de CFM

Para entender de una manera mecánica las posibles alteraciones en las principales vías de señalización plaquetaria, se midieron los niveles de expresión de diferentes receptores en la superficie de las plaquetas mediante CMF. La CMF es una tecnología que permite la medida simultánea de múltiples características de células en suspensión tipo tamaño, complejidad entre otras. Éstas se hacen pasar a través de un pequeño orificio formando una hilera, donde se hace incidir un haz de luz láser. El impacto del láser en cada célula produce señales que son recogidas por distintos detectores que posteriormente son digitalizadas y analizadas.

3.3.2.1 Detección de los receptores de membrana mediante el uso de anticuerpos primarios

Se midieron diferentes receptores relevantes en agregación y activación plaquetaria. Para ello, se utilizaron dos condiciones: sangre total,

cuando los receptores solo se encuentran presentes en plaquetas, y plaquetas lavadas cuando también se encuentran presentes en otros tipos celulares como el caso de P-selectin. Cabe destacar que el anticuerpo específico de GPVI dímero, se une al receptor únicamente si éste está dimerizado, es decir, en su forma activa (76). Este anticuerpo en concreto fue cedido en colaboración con la Prof. Stephanie Jung (Cambridge Cardiovascular, Department of Biochemistry, Cambridge University, UK). Los datos relativos a los anticuerpos se encuentran recogidos en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Anticuerpos primarios utilizados en los estudios funcionales de CFM

ENSAYO	ANTICUERPO	Cf	CONDICIÓN	COHORTE
GPVI total	1G5	10 µg/mL	Sangre total	27
GPVI dímero	204-101	20 µg/mL	Sangre total	12
CD41	PL2-49	10 µg/mL	Sangre total	18
CD42b	ALMA	10 µg/mL	Sangre total	9
CD62P	CD62P	5 µg/mL	Plaquetas lavadas	12
FAB	FAB	20 µg/mL	Sangre total	12
IgG2A	IgG2A	10 µg/mL	Sangre total	27
IgG1	IgG1	10 µg/mL	Sangre total/ Plaquetas lavadas	20

Cf= Concentración final

El protocolo que se llevó a cabo fue:

-Se mezcla 10 µl de sangre total diluida 5 veces o 5x10⁷ de plaquetas lavadas, con 10 µl de anticuerpo primario (v:v) durante 10 min. Todas las incubaciones se hicieron a temperatura ambiente.

-Pasados los 10 min, se añade 1µl del anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa 488. Después de añadir el secundario, se mezcla lentamente para evitar alterar la muestra y se incuba durante 10 min.

-Una vez unido el anticuerpo secundario se diluye la muestra con 200µl Isotón II obteniendo un volumen final de 220µl.

3.3.2.2 Detección de CLEC-2 mediante el uso de *nanobodies*

Para el análisis del receptor CLEC-2 en sangre total se utilizaron *nanobodies* cedidos por el grupo del Prof. Steve Watson (Birmingham Platelet Group. Institute of Cardiovascular Sciences, Birmingham University, UK). El *nanobody* contiene una cola de histidina que permitirá la unión específica al anticuerpo secundario. El protocolo realizado fue el siguiente:

- La sangre total se diluye 100 veces en tampón fosfato salino (PBS). Se añade 1 µL de *nanobody* en 50 µL de muestra, se mezcla con suavidad y se incuba durante 5 min a temperatura ambiente.
- Una vez se ha producido la unión específica de nuestro receptor con el *nanobody*, se añade 10 µL del anticuerpo secundario marcado con el fluoróforo ALEXA 488. Posteriormente la muestra se diluye añadiendo 200 µL PBS.

3.3.3 Detección mediante CFM

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procede a la lectura de la fluorescencia en el citómetro BD Accuri C6 (BD

Bioscience), fijando a 488nm la longitud de onda de excitación y a 530 nm la de emisión (láser azul). Previo a la lectura, se establecen las distintas poblaciones de nuestra muestra: plaquetas y eritrocitos; estos parámetros quedaron fijados para todo el estudio.

En todos los ensayos, la lectura de fluorescencia se basó la intensidad media de fluorescencia (MFI) que viene dada por los 10.000 eventos contados en la población de plaquetas. Todas las lecturas se hicieron en triplicado. Los datos se procesaron mediante el software del equipo (BD CSampler™ Software, BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU) y el software de análisis FlowJo® v10 (FlowJo LLC, Ashland, OR, EEUU).

3.3.4 Ensayos de adhesión plaquetaria en placa

Para determinar la hiperreactividad plaquetaria de los diferentes grupos, se realizaron ensayos de adhesión estática en placa. Para ello, se utilizaron dos ligandos relevantes en la formación del trombo y agregación plaquetaria (colágeno Horm y fibrinógeno) recogidos en la **Tabla 6**. El fundamento de la técnica se basa en la adición de p-nitrofenilfosfato (PNPP), que una vez añadido es catalizado por parte de las fosfatasas de la plaqueta dando lugar a p-nitrofenol (no coloreado). Éste se colorea a pH básico (se alcanza con la adición de NaOH) ya que se desprotona generando así p-nitrofenolato (coloración amarilla).

Tabla 6: Ligandos y sus concentraciones utilizadas en los estudios funcionales de adhesión estática en placa.

RECEPTOR	LIGANDO	CONCENTRACIÓN
GPVI	HORM COLLAGEN	5 µg/mL
INTEGRINA $\alpha\text{IIb}\beta_3$	FIBRINOGENO	100 µg/mL

El protocolo es el siguiente:

- Se cubren placas Nunc MaxiSorp™ (96 pocillos, transparente y de fondo plano) con 50 µL de los ligandos seleccionados a la concentración deseada. Una vez añadida la proteína a la placa, se deja incubando toda la noche a 4°C. El experimento se realizará utilizando tres pocillos por condición.
- A la mañana siguiente, se procede a los lavados de las plaquetas: 3 lavados de 100 µL de PBS por pocillo. Tras los lavados, se añaden 50 µL de albúmina de suero bovino (BSA) al 2% y se incuba la placa durante 1 h en estufa. La BSA se añade para evitar uniones inespecíficas, los controles negativos llevan solo la BSA.
- Tras la incubación, se realizan otros 3 lavados de PBS. Una vez eliminado, se añade 50 µL de plaquetas lavadas a la concentración de 1×10^8 plaquetas/mL y se incuban durante 1h en estufa.
- Una vez transcurrido el tiempo de incubación con las plaquetas, se realizan otros 3 lavados de PBS y se añade 140 µL de la solución sustrato. Ésta se incuba en agitación y a temperatura ambiente durante 40 min.

- Finalmente, se añaden 50 μL de NaOH 3M y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 405nm en Tecan Infinite® M1000 (Thermo Scientific, USA). Los resultados se normalizan en base al control negativo de BSA.

3.4 AISLAMIENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs)

Además del estudio de las plaquetas, la sangre de esos pacientes también se utilizó para estudiar las VEs circulantes. La extracción de sangre se realizó en base a las recomendaciones sugeridas por un comité científico y de estandarización promovido por la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (*ISTH SSC collaborative workshop*) para minimizar el impacto de parámetros preanalíticos en la medición de dichas vesículas (167). El aislamiento de las VEs se realiza durante la primera hora posterior a la extracción siguiendo las recomendaciones del grupo de Lacroix para evitar la generación de VEs ex vivo (168). Como se ha explicado en el **apartado 3.2**, durante el proceso de aislamiento de plaquetas se obtiene una fracción de PPP, que será el punto de partida para el aislamiento de las VEs:

- La fracción de PPP se centrifuga a 1.500g durante 10 min en una centrifuga hematológica eliminando así cualquier resto de plaquetas que haya podido quedar en el plasma.

- Una vez acabada la centrifugación, se recoge el sobrenadante y se dispensa el volumen en tubos de 1,5 mL a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se vuelven a centrifugar 2 min a 15.000g en una centrifuga de ángulo fijo (Eppendorf 5430 R) para eliminar cualquier resto celular.
- Una vez centrifugado se obtiene el plasma libre en plaquetas o PFP, que se congela a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras sólo serán válidas hasta un año en -80°C (169)

El aislamiento de VEs se basa en un protocolo de ultracentrifugaciones seriadas descrito por Ramaccioti y colaboradores añadiendo un lavado adicional de PBS (170).

- El volumen de partida para una extracción óptima de proteína es de 7,2 mL de PFP (6 tubos). Sin embargo, para las validaciones se utiliza 3,6 mL (3 tubos) de PFP ya que la cantidad de proteína requerida era menor.
- A cada tubo se le añaden 1,2 mL de PFP en 3 mL de tampón HEPES y se ultracentrifuga durante 90 min a una velocidad de 200.000g y una temperatura de 4°C.
- Una vez acabada la primera ultracentrifugación, se retira el sobrenadante y se resuspende el *pellet* utilizando 4 mL de KBr 0,25 M que se incuba durante 20 min en hielo. El KBr (bromuro potásico) se utiliza para solubilizar proteínas del plasma (ej. lipoproteínas).

Posteriormente, se vuelve a ultracentrifugar siguiendo las mismas condiciones iniciales.

- Se elimina el sobrenadante y se hace un lavado extra de PBS para intentar eliminar posibles contaminaciones que queden en la muestra. Se realiza la última ultracentrifugación siguiendo las mismas condiciones.
- Tras desechar el sobrenadante, las VEs quedan en el fondo del tubo y se secan al aire. Finalmente, se añaden 45 μ L del tampón correspondiente para disolverlas. Dependiendo del procedimiento proteómico que se vaya a realizar se utilizan diferentes tampones: 2D-DIGE o un tampón para LC-MS/MS basado en 2% SDS.

3.5 CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Uno de los puntos importantes del estudio de VEs es saber con certeza que lo que estamos analizando son VEs y no contaminaciones de proteínas plasmáticas. La ISEV (*International society of Extracellular Vesicles*) recomienda usar al menos dos técnicas diferentes a la hora de caracterizar las muestras (112). En este apartado se detallan tres de las técnicas de caracterización utilizadas (microscopía electrónica, rastreo de nanopartículas y citometría de flujo); la cuarta (inmunodetección monodimensional) se describe posteriormente en el **apartado 3.8.3**.

3.5.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión, también conocida como TEM, es uno de los métodos de imagen por excelencia para todos los estudios de VEs. Debido a su alta resolución, éste permite determinar el tamaño y la morfología de manera individual.

Una vez eliminado el sobrenadante de la tercera ultracentrifugación, el pellet de VEs se resuspende con un 10% de glutaraldehído. A continuación, se deposita una gota de la muestra sobre la rejilla de cobre cubierta con una membrana de Formvar. La muestra se contrasta con acetato de uranilo al 2% durante 1 min y se observan en el microscopio JEOL JEM-1011 (JEOL, Inc., Peabody, MA) en la Unidad de Microscopía de Lugo (RIAIDT).

3.5.2 Análisis de rastreo de nanopartículas (NTA)

El análisis de rastreo de nanopartículas (NTA) permite una determinación rápida del tamaño y la cantidad de partículas que se encuentran en la muestra en suspensión.

Una vez eliminado el sobrenadante de la tercera ultracentrifugación, uno de los tubos se utiliza para la caracterización mediante NTA. La muestra se resuspende en 100 µL aproximadamente de PBS. Posteriormente, se realiza una dilución (1:1.000) de la muestra y se introduce en el equipo NanoSight NS300 (Malvern Panalytical (UK)) mediante la ayuda de una jeringa.

3.5.3 Citometría de Flujo (CMF)

Una de las técnicas más comunes para caracterizar VEs es CMF ya que es capaz de distinguir células dependiendo de su origen con la ayuda de anticuerpos específicos. Dado que las VEs son de un tamaño máximo de 1.000 nm, son muy difíciles de detectarlas utilizando citómetros convencionales. Un consorcio de grupos de investigación (*ISTH-SSC working group*) liderados por la Prof. Lacroix ha propuesto el uso de un protocolo basado en esferas de poliestireno para la detección de VEs mediante CMF. Con la ayuda de las esferas la población de EVs se diferencian de manera más precisa y con una mayor resolución en el análisis que sin ellas (171). El estudio de caracterización se realizó con un total de 10 muestras, 5 procedentes a pacientes obesos y 5 a controles delgados.

Megamix-Plus SSC (BioCytex) es una mezcla de bolitas de poliestireno fluorescentes de diferentes diámetros (0,1; 0,3; 0,5 y 0,9 mm) que se utilizan para situar la población de VEs y así estandarizar los parámetros del citómetro. La configuración del citómetro FACSCalibur (BD bioscience) es el siguiente: SSC 580 log; FL1 825 log; FL2 646 log 93 (FL1), 45 (FL2); FL3 650 ln; y la compensación: FL1 -1,0% FL2 y FL2 -16,5% FL1.

El protocolo utilizado está basado a partir de un trabajo multicentro realizado por Cointe y colaboradores (172) y consta de los siguientes pasos:

- Se descongela aproximadamente 1 mL de PFP en hielo y se atemperan las *MP-Count beads* (BioCytex) 30 min antes de su uso. Las *MP-Count beads* son un mix de bolitas de 3 μ M de diámetro que sirve para medir el número total de vesículas presentes en la muestra.
- Previamente, se añade 30 μ L de las bolitas a 1 mL de PBS filtrado y se mide en el citómetro para poder determinar la cantidad de VEs presentes en la muestra.
- Posteriormente, se procede al análisis de la muestra. Se le añade el anticuerpo correspondiente a la muestra (marcaje único (CD41) o marcaje doble (CD41/Anexina V). Los datos de los anticuerpos y sus cantidades se encuentran recogidos en la **Tabla 7**.
- Una vez añadido el anticuerpo, todas las reacciones se incuban 20 min en oscuridad.
- En todos los casos, se fija la lectura en 1 min y se procede a la lectura de la fluorescencia teniendo en cuenta la media de la intensidad de fluorescencia. Todas las mediciones se realizan en triplicado

Tabla 7: Anticuerpos y cantidad de muestra utilizada en la caracterización de VEs por CMF.

MARCAJE	PFP	ANEXINA V-FITC	CD41-PE	TAMPÓN DE UNIÓN	PBS
CD41	30 μ L	-	5 μ L	-	1 mL
Anexina V/CD41	30 μ L	10 μ L	30 μ L	1 mL	-

3.6 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

3.6.1 Lisis de proteínas

Una vez acabado el *resting*, la suspensión de plaquetas se lisa para su posterior uso en las diferentes aproximaciones. En el caso de los ensayos proteómicos basados en 2D-DIGE, la lisis se realizó con un tampón basado en NP-40. Para ello, se le añade 500 μL del tampón de lisis (NP-40) a la suspensión de plaquetas (concentración 8×10^8 plaquetas/mL) y se congela a -80°C hasta su posterior uso. Para los estudios de fosfoproteómica, se le añadió a la solución de plaquetas (800 μL , concentración 8×10^8 plaquetas/mL) 200 μL SDS 10%, obteniendo como concentración final 2% SDS.

3.6.2 Precipitación de proteínas

La precipitación de proteína se llevó a cabo en aquellas muestras que iban a ser utilizadas para la proteómica en gel y las validaciones.

Para la precipitación de proteínas, se encuentran congeladas en un volumen aproximado de 1 mL con el tampón de lisis. A éste se le añade 500 μL de ácido tricloroacético (ATC) al 60%, siendo la concentración final de TCA del 20%. Posteriormente, las muestras se someten a pulsos de ultrasonidos de manera intermitente con un sonicador Branson Sonifier® S-150D, y se deja reposar en hielo durante 45 min. Una vez transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugan durante 2 min a 10.000g en una centrifuga de ángulo fijo y se descarta el sobrenadante por decantación. El pellet se lava dos veces más con 500 μL de acetona

fría siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Las muestras se resuspenden en 50-60 μL del tampón deseado dejando reposar alrededor de 4 horas a temperatura ambiente. En nuestro caso, el tampón utilizado tiene que ser compatible con la tinción 2D-DIGE. Finalmente, la muestra se centrifuga de nuevo a 10.000g durante 2 min y se recoge el sobrenadante, descartando el material que no se haya solubilizado adecuadamente.

3.6.3 Cuantificación de proteína

El método de cuantificación se utilizó dependiendo de las propiedades del mismo y las compatibilidades del tampón en el que estuviera diluida la muestra.

3.6.3.1 Cuantificación de proteína por el método Bradford

El método Bradford es un método de cuantificación colorimétrico donde se utiliza el reactivo Commassie Plus. El protocolo consta de dos partes: la preparación de la recta patrón y la cuantificación de la muestra proteica.

Preparación de la recta patrón

- Se preparan 6 diluciones seriadas a partir de una solución de BSA (2 mg/mL), siendo cada una de ellas 1/2 de la anterior, con un volumen final de 20 μL y utilizando como diluyente el tampón de la muestra. Todas las diluciones se preparan por duplicado.

- Se añade 600 μL del reactivo Commassie Plus (previamente atemperado) a las diluciones y se incuba durante al menos 10 min.
- Se lee la absorbancia en un espectrofotómetro Genesys 20 a una longitud de onda de 595 nm, utilizando como blanco la mezcla de 20 μL del diluyente y los 600 μL del reactivo. Se calcula las medias de los valores de absorbancia para cada punto de la recta patrón y se genera la recta de regresión con los datos obtenidos para cada concentración.

Cuantificación de la muestra de proteína

Se añade 1 μL de la muestra a 600 μL del reactivo Commassie Plus y, tras mezclar bien la solución, se incuba durante al menos 10 min a temperatura ambiente. Se lee la absorbancia en el espectrofotómetro a la misma longitud de onda, utilizando como blanco 1 μL del diluyente en 600 μL del reactivo. Se calculan las medias de los valores de absorbancia y se calculan las concentraciones en base a la recta patrón obtenida previamente.

3.6.3.2 Cuantificación de proteína por el método Pierce 660

El método Pierce 660 es un método de cuantificación compatible con muchos detergentes, agentes reductores y otros reactivos. Al reactivo se le añade unos polvos (IDCR, Ionice Detergente Compatibility Reagent) permitiendo que la técnica sea compatible con nuestras muestras (2%

SDS). El protocolo es similar al método Bradford, sin embargo, tiene una serie de variaciones que citaremos a continuación.

Preparación de la recta patrón

Se preparan 6 diluciones seriadas a partir de una solución diluida de BSA (1,4 mg/mL), siendo cada una de ellas 1/2 de la anterior, con un volumen final de 40 μ L y utilizando como diluyente el tampón de la muestra. Todas las diluciones se preparan por duplicado. Al reactivo Pierce 660 se le añade polvos IDCR, 1 gr por cada 20 mL de reactivo. Se añaden 600 μ L del reactivo (10 min) y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm.

Cuantificación de la muestra de proteína

La muestra se diluye 10 veces para que los valores de absorbancia se encuentren dentro de la curva (estimación de concentración inferior a 1 mg/mL). Se añade 40 μ L de la muestra a 600 μ L del reactivo, tras mezclar bien la solución se incuba durante 10 min a temperatura ambiente. Se lee la absorbancia en el espectrofotómetro a 660 nm. Se calculan las medias de los valores de absorbancia y las concentraciones en base a la recta patrón obtenida previamente.

3.6.3.3 Cuantificación de proteína por el método microBCA™

El kit microBCA™ se aplica a muestras que tienen un porcentaje máximo de 5% SDS. El primer paso es la preparación del reactivo:

consiste en mezclar MA, MB y MC en una proporción 25:24:1, respectivamente.

A partir de una solución BSA (50 $\mu\text{L/mL}$), se prepara 6 diluciones (15 $\mu\text{g/mL}$; 12 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 8 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; y 2 $\mu\text{g/mL}$), con un volumen final de 1 mL y utilizando como diluyente H_2O ultrapura. La muestra se diluye 100 veces en H_2O ultrapura siendo el volumen final 800 μL . Las mediciones se hacen por cuadruplicado.

En una placa de 96 pocillos, se añade 150 μL de la proteína, tanto la recta como las muestras previamente diluidas. Sobre estos pocillos se añade 150 μL del reactivo microBCA™ y se deja incubar la placa durante 2h a 37°C. Posteriormente, se añade 200 μL de cada uno de nuestros puntos a una placa de lectura, evitando la formación de burbujas ya que puede alterar la medición, y se lee la absorbancia a 562 nm. Para cada punto de las diluciones de BSA estándar, se calcula la media y se genera una recta patrón por regresión lineal. Se calcula también las medias de los valores de absorbancia de las muestras, y posteriormente se obtiene las concentraciones de las mismas utilizando la recta patrón.

3.7 ESTUDIOS PROTEÓMICOS

Durante la tesis doctoral se realizaron diferentes técnicas proteómicas, éstas se pueden separar en dos grandes grupos en gel y libres de él.

3.7.1 Métodos basados en gel

3.7.1.1 Electroforesis monodimensional (SDS-PAGE)

La electroforesis monodimensional SDS-PAGE se utiliza para separar por tamaño las proteínas de una muestra heterogénea. Previo a la electroforesis, las muestras se someten a un proceso de desnaturalización y reducción mediante un tampón reductor Laemmli 5X. Posteriormente, las muestras se calientan durante 5 min a 105°C salvo aquellas muestras que se encuentren disueltas en un tampón que contenga urea o tiourea dado que se produciría la carbamidación de la muestra.

Se cargan entre 5 y 10 µg de muestra en los pocillos del gel correspondiente, incluyendo si se requiere un marcador de peso molecular. Las condiciones de la electroforesis son hasta un máximo de 150V en una cubeta XCell SureLock™ Mini-Cell. Se utilizan diferentes tampones de electroforesis dependiendo si son geles comerciales NuPAGE (tampón MOPS) o no (tampón de electroforesis convencional). La electroforesis finaliza en el momento en el que la muestra se haya separado completamente.

3.7.1.2 Tinción

Una vez acabada la electroforesis, los geles se pueden teñir o continuar con la inmunodetección (**apartado 3.9.3**). En el caso de la tinción, se han realizado dos métodos diferentes: SYPRO® Ruby (Invitrogen) y tinción con plata.

SYPRO[®] Ruby

Previo a la tinción, los geles se lavan durante 10 min con H₂O ultrapura. Todo el proceso se hace en agitación. A continuación, se añaden 50 mL de tampón de fijación durante 1 h. Una vez la proteína está fijada, se añaden 50 mL de SYPRO[®] Ruby toda la noche en oscuridad. Al día siguiente, se lavan los geles alrededor de 10 min en H₂O ultrapura y se obtiene la imagen del gel en GEL DOC XR, utilizando el filtro 630BO30 62 nm.

Tinción con Plata

Una vez finalizada la electroforesis, se añaden alrededor de 50 mL de la solución de fijación y se fija durante 30 min. Como en el anterior apartado, toda tinción se realiza en agitación. Después de ese tiempo, se añade el tampón de sensibilización y se incuba durante 30 min y se lavan los geles durante 5 min. Este procedimiento se realiza 3 veces. A continuación, se prepara la solución con la plata y se añaden unos 50 mL por gel y se tiñe durante 20 min en oscuridad. Una vez acabada la tinción, se vuelve a lavar tres veces en las mismas condiciones y se procede al velado (Na₂CO₃ 2,5% p/v). El velado de los geles puede tardar de 2 a 20 min dependiendo de la cantidad de proteína, una vez se consigues el velado correspondiente se para la reacción, se lava un par de veces y finalmente se obtiene la imagen del gel.

3.7.1.3 Electroforesis bidimensional: 2D-DIGE

El 2D-DIGE es una técnica proteómica que permite identificar dos muestras diferentes en un mismo gel. La técnica consta de tres fluoróforos, dos tiñen las muestras de manera aleatoria y un tercero marca el estándar interno que es una mezcla equitativa de ambas muestras. Estos fluoróforos se unen covalentemente a las proteínas para su posterior identificación por fluorescencia. Con esta técnica se analizaron tanto las plaquetas como las VEs de pacientes obesos comparándolos con sus controles delgados pareados por edad y sexo. En ambos estudios se realizaron 6 geles (replicas técnicas) a partir de *pools* de 10 individuos por grupo.

3.7.1.3.1 Marcaje de la muestra con fluoróforos

Para que la reacción de marcaje se produzca con éxito, las muestras deben estar a un pH entre 8 y 8,5. Además, es importante tener en cuenta que las muestras no deben tener compuestos reductores, como el DTT o el TBP, ya que disminuiría el rendimiento entre la unión fluoróforo-proteína. Se carga un total de 150 µg de proteína por gel, 50 + 50 µg de ambas condiciones y otros 50 µg del estándar interno. El protocolo de marcaje fue el siguiente:

- Los fluoróforos se reconstituyen en dimetilformamida anhidra a una concentración *stock* de 1.000 pmol/µL. Para su utilización, se diluyen hasta una concentración de 400 pmol/µL.

- Se marcan con 50 μg de muestra con 1 μL de fluoróforo y se incuba 30 min en hielo. Todo el procedimiento se hace en oscuridad. La reacción de unión (proteína-fluoróforo) se para con 1 μL de lisina 10 mM durante 10 min en hielo. Una vez parada la reacción, se mezcla las tres muestras y se dejan 15 min en hielo.
- Por último, se diluye las muestras con los tampones correspondientes: tampón de muestra 2-DE, tampón de muestra 2X, y anfolitos a una concentración final 1,6% (v/v) (SERVA Electrophoresis GmbH). La muestra ya está lista para la electroforesis bidimensional.

3.7.1.3.2 Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional está compuesta por 4 fases: rehidratación, 1ª dimensión, equilibrado y 2ª dimensión.

- La **rehidratación de la tira** se realiza mediante una rehidratación pasiva que dura entre 14-16 h. Las tiras utilizadas tienen un gradiente de pH 4-7 y son de 24 cm (GE Healthcare). Se dispensa la muestra en una bandeja de rehidratación (Immobiline DryStrip Reswelling Tray, GE Healthcare) donde posteriormente se coloca la tira en contacto con el gel. Para evitar que la muestra se evapore, se cubre con un aceite mineral DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) y se deja hidratando toda la noche.

- Tras la rehidratación, se procede al **isoelectroenfoque (IEF)** o también conocido como la primera dimensión. Para ello, se coloca las tiras IPG en el Multiphor II o IPGphor 3, ambos de GE Healthcare. Se humedecen unas pequeñas tiras de papel que serán las responsables de que pase la corriente a la tira y absorban las posibles sales que queden en la muestra. Una vez montado todo, se cubre las tiras IPG con aceite mineral, se colocan los electrodos y se corre el isoelectroenfoque siguiendo el programa correspondiente que se encuentra reflejado en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Programa del IEF para muestras en tiras IPG de 7 y 24cm.

TIRAS IPG	FASE	VOLTAJE (V)	AMPERAJE (mA)	POTENCIA	TIEMPO
7 cm	1	200	3	5	5 min
	2	3.500	10	5	1h 30 min
	3	3.500	10	5	1h 40 min
24 cm	1	300	3	5	1 min
	2	300	10	5	2 h
	3	3.500	10	5	3 h
	4	3.500	3	5	20 h

- Una vez acabada la primera dimensión se realiza el **equilibrado de las tiras**. La función principal es cargar la muestra negativamente con SDS, reducirla y alquilarla. Primero, se reduce la muestra añadiendo el tampón de equilibrado con compuesto reductor (DTT) y se incuba durante 15 min en agitación. El DTT permite que las proteínas se encuentren desnaturalizadas reducidas evitando así que

se vuelvan a formar enlaces disulfuro. Después de los 15 min, las tiras se alquilan con iodoacetamida (IAA) de la misma manera que con el DTT. La IAA permite que los grupos sulfhidrilo se encuentren protegidos de reoxidaciones y así se puedan identificar mejor por espectrometría de masas.

- La **segunda dimensión** se realiza en un sistema IPGPhor 3 o Multiphor (GE Healthcare) siguiendo el programa descrito a continuación: Fase 1- 80 V, 20 mA/gel, 2 W/gel durante 1 hora; Fase 2- 500 V, 40 mA/gel, 17 W/gel (máximo 100 W) durante un máximo de 6 horas.

3.7.1.3.3 Escaneado de geles y análisis de imagen

Una vez terminada la electroforesis, los geles se escanean directamente en un escáner Typhoon FLA 7.000 (GE Healthcare). Los parámetros que se utilizaron fueron: Cy2 - 500 nm/ 520 BP 40, Cy3 - 550 nm/ 580 BP 30, Cy5 - 600 nm/ 670 BP 30.

Tras el escaneado, se importan las imágenes a un software de análisis de imagen llamado Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics Ltd. Newcastle, Reino Unido) versión 4.5. El fundamento básico del programa es detectar las diferencias entre proteínas por superposición de imagen. Primero se seleccionan todas las imágenes a comparar y se alinean entre ellas. Una vez comparado todos los geles entre sí, se realiza el test estadístico ANOVA considerando que una mancha es diferencial cuando presenta una variación de expresión (FC)

mayor a $>1,2$ (estudio del proteoma plaquetario) y $FC > 1,5$ (estudio del proteoma de VEs) y con un $p < 0,05$ en ambos.

3.7.1.3.4 Escisión de las proteínas de interés

Las manchas seleccionadas fueron cortadas de los geles mediante la visualización de las mismas en un transiluminador de luz azul DR-45M (Clare Chemical Research, Dolores, CO, EEUU). Para aquellas manchas que eran difíciles de identificar en los geles de 2D-DIGE, se prepararon geles semipreparativos. Estos geles contienen un total de 300 μg de proteína lo que hace más fácil su visualización en el gel y su posterior escisión. Las manchas se introdujeron en un tubo con alrededor 20 μL de H_2O ultrapura para evitar su deshidratación.

3.7.1.4 Espectrometría de masas acoplada a 2D-DIGE

Una vez obtenida las manchas, se identificaron mediante espectrometría de masas. Aquellas manchas que tenían más cantidad de proteína se llevaron a la Unidad de Proteómica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS) y se detectaron utilizando un MALDI-TOF/TOF. En cambio, aquellas que tenían menor cantidad de proteína se llevaron a analizar a un espectrómetro más sensible (nano-LC acoplado a espectrómetro con un analizador de trampa iónica) en el Servicio de proteómica de la *Universidad de Santiago de Compostela*.

3.7.1.4.1 Digestión en gel

La digestión trípica en gel se llevó a cabo de manera manual y utilizando el protocolo estandarizado propuesto por Shevchenko y colaboradores con pequeñas variaciones (173).

Previo a su digestión, las muestras se lavan tres veces con 100 μ L de bicarbonato amónico 50 mM en 50% de metanol. Posteriormente, se reducen con DTT 10 mM durante 30 min a 56°C. Una vez se encuentran reducidas, se lava de nuevo con bicarbonato amónico (3 veces), se deshidrata el gel con acetonitrilo (ACN), se secan en el *SpeedVac* (Thermo Scientific, USA) y finalmente se alquilan con IAA 55 mM durante 20 min en oscuridad.

Tras la alquilación, se lava la muestra 3 veces con bicarbonato amónico, se deshidrata y se vuelve a secar con el *SpeedVac*. Posteriormente, se añade tripsina porcina modificada (Promega, Madison, WY EEUU) a una concentración final de 20 ng/mL en bicarbonato amónico 20 mM, y se incuba durante toda la noche a 37°C. Finalmente, al día siguiente se extraen los péptidos del gel. Para ello, se añaden 40 μ L de una solución 60% ACN y 0,5% ácido fórmico (AF). Este procedimiento se realiza por triplicado. Una vez acabado, las muestras se secan en el *SpeedVac* y se guardan a -20°C.

3.7.1.4.2 Maldi-TOF/TOF

Las manchas proteicas más intensas se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 (ABSciex, Framingham, MA, EEUU) mediante el protocolo descrito a continuación:

- Los péptidos se disuelven en 4 μ L de 0.5% de FA. Una vez disueltos, se añade la misma cantidad de muestra y de matriz (0,5 μ L) en una placa 384 Opti-TOF 123x81 mm MALDI plata (Applied Biosystems) y se dejan secando a temperatura ambiente. La matriz está compuesta de 3 mg de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico disuelto en 1 mL de 50% ACN y 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA).
- Los espectros se obtienen en modo reflector positivo con un láser Nd:YAG (longitud de onda utilizada 355 nm y frecuencia láser 200 Hz), y se lanzan entre 1.000 y 2.000 disparos. Después se procede a la calibración interna del espectro de masa del MALDI-TOF usando dos picos de autocatálisis de tripsina con m/z de 842.510 y 2211.105. La calibración del MALDI-MS/MS se lleva a cabo mediante iones fragmentados de Angiotensina II (estándar de calibración, Bruker). Todos los espectros MSMS se realizan seleccionando los precursores con una resolución relativa de 300 (*full width at half maximum*, FWHM) y supresión metaestable.
- El software que se utilizó para el análisis fue 4000 Series Explorer Software V3.5 (Applied Biosystems) y el motor de búsqueda utilizado es Mascot v2.1 (Matrix Science, Londres, Reino Unido). La identificación de las proteínas se realizó con la base de datos

SwissProt (versión 2016-05; Febrero, 552.293 entradas). Las búsquedas fueron restringidas a la taxonomía humana (modificación fija carbamidometil cisteína y modificación variable metionina oxidada). Se estableció como límite de tolerancia 100 ppm para el precursor y 0,3 Da para MS/MS, permitiendo así un único fallo en la fragmentación tríplica.

- Tanto el espectro de MALD-MS(/MS) como la búsqueda en la base de datos fueron inspeccionados manualmente y en detalle. Para los espectros PMF, las identificaciones aceptadas son aquellas que tienen un intervalo de confianza (C.I.%) del 99% o superior. Los espectros combinados aceptados (MS y MS/MS) debían tener un C.I.% de 95% o superior. Este valor significa que la probabilidad de que la combinación haya sido al azar es inferior al 5%.

3.7.1.4.3 LC-MS/MS en trampa iónica

Las manchas menos intensas se llevaron a un equipo más sensible, en este caso un espectrómetro de masas con un analizador de trampa iónica. El protocolo fue el siguiente:

- Los péptidos digeridos se disuelven con 0,1% de FA y posteriormente separados por un EASY-nLC (Proxeon, Bruker Daltonik GmbH) con una nanocolumna de fase reversa. Los parámetros se encuentran en la **Tabla 9**.

- Una vez se han ionizado los péptidos, se analizan automáticamente en un CID-ETD espectrómetro de trampa iónica (Bruker Daltonics) equipado con una fuente de ionización Nanoespray para MS/MS. Los espectros se adquieren en un modo de resolución mejorada. Los siguientes parámetros se encuentran recogidos en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Configuración de la cromatografía líquida y el espectrómetro de masas

CONFIGURACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	
Sistema	Easy-nLC PROXEON
Columna trampa	Easy-Column SC001 L 2cm, ID 100 µL, 5 µL, 120 Å, C18-A1 (Proxeon)
Columna analítica	Easy-Column SC200 C18 3 µm, 120 Å, 360 µm OD/75µm ID, L=10cm (Proxeon)
Ratio de flujo	300 nl/min
Eluientes	A= 0,1% FA en agua ultrapura / B= 0,1% de FA en ACN
Gradiente	5% (t=0 min), 35% (t=32 min), 50% (t=37 min), 100% (t=38 min)
CONFIGURACIÓN DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS	
Fuente	Nanosprayer®
Modo de escaneo MS	Modo de resolución mejorada (8.100 m/z s^{-1})
Rango de escaneo MS	50-3.000 Da
Media de los espectros MS	5
Modo de escaneo MS/MS	UltraScan
Rango de escaneo MS	100-3.000 m/z
Número de precursores	3
Ancho de aislamiento	4 m/z

CONFIGURACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	
Media de los espectros MS/MS	2
Fragmentación CID	30-300%
Fragmentación EDT	100 ms

- El análisis de las masas se lleva a cabo mediante Analysis 4.0 and BioTools 3.2 from Bruker Daltonik GmbH. El motor de búsqueda fue Mascot v2.3.0 search tool (Matrix Science, London, UK) mediante SwissProt (SwissProt_2016_09.fasta). La búsqueda fue restringida a la taxonomía humana, permitiendo la modificación fija carbamidometil cisteína y la modificación variable metionina oxidada).
- La tolerancia de la masa del precursor y la de MS/MS se fijaron en 0,3 y 0,4 Da, respectivamente, permitiendo un fallo en la fragmentación tríptica. Los espectros y los resultados obtenidos de las bases de datos se inspeccionan manualmente con el software mencionado, especialmente en el caso de las identificaciones basadas en un solo péptido. En el caso de aquellas identificaciones basadas en un único péptido, solo se consideraron válidas aquellas en las que se obtiene más del 50% de los iones “y” para el péptido y además solo en el caso de que dicho péptido tenga al menos ocho aminoácidos (sin fallo de fragmentación tríptica). Las

identificaciones positivas corresponden a valores de mascot superiores a 40.

3.7.2 Métodos de digestión libres de gel

3.7.2.1 Digestión FASP/LFASP

La digestión FASP (*Filter-Aided Sample Preparation*) es un procedimiento de digestión donde la proteína se encuentra en solución y en el que por lo general, se obtiene un mayor rendimiento que en los procedimientos de digestión en gel (174). Dependiendo de la cantidad de proteína a digerir, se utilizaron diferentes filtros: filtros de 10 kDa Amicon™ Ultra- 0.5 para FASP o Amicon™ Ultra-15 para LFASP). Para el estudio de las VEs se utilizó la digestión FASP con tampón TEAB. Por otro lado, para el estudio del fosfoproteoma plaquetario se utilizó la digestión LFASP dado que había que digerir una muestra proteica más grande. En este caso el tampón utilizado fue el bicarbonato amonico. La cantidad de proteína digerida se encuentra especificada en la **Tabla 10**. Tanto en la fosfoproteómica como en el estudio de VEs, se analizaron 4 *pools* de 3 individuos.

Tabla 10: Cantidad de muestra digeridas mediante FASP y LFASP

ESTUDIO	FILTRO	CANTIDAD DIGERIDA	COHORTE TOTAL	CENTRIFUGACIÓN
Fosfoproteoma	Amicon™ Ultra-1.5 (LFASP)	1,2 mg	24	30 min a 14.000G
Proteómica dirigida	Amicon™ Ultra-1.5 (LFASP)	600 µg	14	30 min a 14.000g
Estudio VEs	Amicon™ Ultra-0.5 (FASP)	70 µg	24	15 min a 14.000g

3.7.2.1.2 Digestión FASP

La digestión FASP (Amicon™ Ultra-0,5) tiene una duración de 2 días y el procedimiento es el siguiente:

- Acondicionamiento de los filtros: se lavan las membranas con 400 μ L de NaOH 0,1 M y posteriormente con 400 μ L de agua ultrapura durante 10 min a 14,000g y a una temperatura de 13°C.
- Se descongelan las muestras durante 10 min en el Eppendorf Thermomixer® comfort a 600 rpm y 20°C.
- Se añade DDT 0,1 M para obtener una concentración final de 20 mM. Se calientan las muestras durante 5 min a 99°C en el Eppendorf Thermomixer® comfort. Una vez las muestras están atemperadas, se diluyen 20 veces con tampón basado en urea (tampón UA). El máximo volumen por filtro es de 450 μ L y se hacen alrededor de 4 pases por muestra. Cada vez que se añade muestra al filtro, se realiza una centrifugación de 15 min a 14,000g (13°C).
- Los lavados se llevan a cabo con tampón UA (200 μ L, 2 veces) y posteriormente las muestras se alquilan con IAA 0,05 M durante 20 min en agitación (400 rpm).
- Una vez alquiladas, los filtros se lavan 3 veces con tampón UA y después 4 veces con TEAB. Una cosa a tener en cuenta es mezclar bien la muestra que se encuentra en el filtro con el tampón añadido para evitar posibles restos de urea en el filtro. Las centrifugaciones se realizaron a 14,000g (13°C) durante 10 min.

- Después de los lavados con TEAB, las muestras se digieren con tripsina (Promega) con un ratio proteína-enzima de 5:100 (v/v) durante 18 horas a 37° en agitación y oscuridad.
- Al día siguiente, se pesan los tubos de elución vacíos para calcular el volumen de muestra que tenemos. Se centrifugan los filtros para bajar el eluido y posteriormente se añade 100µL TEAB (3 veces) para acabar de eluir la muestra. En el caso de la digestión LFASP, se añade bicarbonato amónico 20 mM, se agita durante 5 min a 600 rpm y 25°C, y se centrifuga de nuevo. Este paso se realiza dos veces en total, obteniendo el eluido de 3 centrifugaciones en un mismo tubo colector. El volumen teórico final es de 6,2 mL
- Una vez se tiene el eluido, la muestra se concentra mediante evaporación en el SpeedVac. Los concentrados peptídicos digeridos con FASP son evaporados a sequedad y se resuspenden en 20 µl de 5% metanol; 0,5% TFA que inyectan directamente en el HPLC (*high pressure liquid chromatography*) para su posterior análisis en el LTQ Orbitrap XL (ver apartado 3.7.2.4). En cambio, los péptidos digeridos con LFASP se acidifican con TFA, a una concentración final de 1% TFA y estas se congelan a -80°C hasta su posterior liofilización.

3.7.2.2 Preparación de la muestra para el enriquecimiento de los fosfopéptidos

Previo al enriquecimiento de los fosfopéptidos, las muestras se tienen que concentrar y desalar. Estos procedimientos se detallaron a continuación:

Concentración de la muestra

Una vez congelada la muestra se procede a la concentración de la muestra de péptidos mediante la liofilización del eluido en un liofilizador CRYODOS. Una vez lista la muestra, se resuspenden los *pellets* en 3 ml de 1% TFA y se procede al desalado de las mismas.

Desalado de la muestra

El desalado de la muestra se realiza en cartuchos C18 (Elubond). El sistema de desalado consta de cuatro partes: el manifold Visipret, la bomba de vacío, la trampa para disolventes y el soporte para tubos. Durante todo el proceso los cartuchos no deben quedarse nunca secos.

El primer paso es el acondicionamiento de la columna donde se realizan tres lavados de ACN/H₂O ultrapura (3 mL cada vez) y posteriormente tres lavados de 0,1% TFA (3 mL cada vez). El fin de preparar las columnas es eluir las posibles inespecificidades que pueda haber en ella. Una vez acondicionado el cartucho, la muestra se pasa dos veces con un flujo muy lento a través de la fase para evitar posibles pérdidas. Una vez se encuentra retenida, se lava la columna tres veces con 0,1% TFA (3 mL). Finalmente, la muestra se eluye añadiendo 1 mL

de ACN/ H₂O ultrapura/0,25% TFA, se realizará este proceso tres veces obteniendo un volumen final de 3 mL.

3.7.2.3 Enriquecimiento de péptidos fosforilados mediante TiO₂

Para el estudio del fosfoproteoma plaquetario de los pacientes obesos se llevó a cabo un enriquecimiento de péptidos tripticos fosforilados en serina, treonina y tirosina mediante óxido de titanio (TiO₂). El estudio se realizó con una cohorte de 12 pacientes y sus controles delgados, distribuida en 4 pools de tres individuos, obteniendo tanto replicas técnicas como biológicas. Para el estudio de proteómica dirigida, se utilizaron una cohorte de 7 pacientes obesos y sus controles delgados pareados por edad y sexo.

El óxido de titanio tiene unas propiedades excepcionales como intercambiadores de iones lo que hace que se una a los péptidos fosforilados. El procedimiento de enriquecimiento se detalla a continuación:

En primer lugar, se preparan esferas de titanio (Titansphere) con el tampón de equilibrado. Una vez calculado la cantidad de tampón que hay que añadirle para que quede una concentración 1:1 (v/v), las bolitas se equilibran durante 30 min en el Thermomixer (24°C a 400g).

Las muestras previamente desaladas (**apartado 3.7.2.2**), se le añaden 600 µl del tampón de equilibrado y se incuban durante 10 min en el Thermomixer (400g) para asegurar que las muestras se han disuelto correctamente. Posteriormente se añaden 3,6 mg de TiO₂ (0,6

mg TiO₂/100 µg péptido) a las muestras y se dejan incubando durante 25 min.

Se transfieren las muestras a un mobicol con un filtro de 10 µm y se centrifuga 75 s a 0,1g.

Posteriormente, se realizan dos lavados (150 µl de tampón de lavado), el primero en el mismo tubo de la muestra para evitar posibles pérdidas. Se hacen centrifugaciones de 60 s a 0,1g.

Una vez lavado el mobicol, se añaden 10 µl de 20% de AF al tubo donde se van a eluir los péptidos enriquecidos. La elución se hace mediante eluciones secuenciadas: 15 µl del tampón de elución 1 (x2) y seguidamente 5 µl del tampón de elución 2 (x2), teniendo como volumen final alrededor de 70 µl.

3.7.2.4 Espectrometría de masas acoplada a *Label Free*

3.7.2.4.1 LC-MS/MS en LTQ Orbitrap XL

Tanto el análisis de las VEs como de las muestras enriquecidas en fosfopéptidos mediante TiO₂ se llevaron a cabo en el laboratorio de proteómica CSIC-UAB de la Universidad Autónoma de Barcelona, empleando un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL equipado con un nanoESI.

Dependiendo de la complejidad de la muestra se cargaron distintas cantidades de proteína. En el caso del estudio del proteoma de las VEs se utilizó 1µg. En cambio, para el estudio de muestras enriquecidas en fosfopéptidos mediante TiO₂ se inyectó el 10% de la

muestra digerida, es decir, alrededor de 6µg. El protocolo llevado a cabo fue el siguiente:

- Las muestras previamente llevadas a sequedad se le añaden 20 µL en 5% metanol y 0,5% TFA. Posteriormente, se cargan en la precolumna C18 (Agilent Technologies) donde se lleva a cabo la concentración de péptidos.
- La precolumna está conectada a una columna C18 de 15 cm de longitud y 100µm de diámetro interno (Thermo Scientific). Las condiciones de separación son las siguientes: 0,4µL/min en un gradiente de ACN (3-35%) durante 120 min. El solvente A es 0,1% FA y el solvente B ACN/0,1% FA.
- El sistema HPLC está compuesto por una bomba capilar y una bomba binaria Agilent 1200.
- El LTQ Orbitrap XL se utiliza en modo positivo con un voltaje de 1,8 kV. El análisis espectrométrico se lleva a cabo en modo DDA (*data dependent acquisition*), adquiriendo un barrido completo, seguido de 10 MS/MS de las 10 señales más intensas en una trampa lineal. Los espectros correspondientes al barrido completo (m/z 400-1650) se obtienen con una resolución de 60.000.

3.7.2.4.2 Análisis de imagen diferencial mediante Progenesis QI

Tras el análisis, los ficheros crudos de MS se importan a un software de análisis de imagen llamado Progenesis QI (versión 4.0; Nonlinear

Dynamics Ltd. Newcastle, Reino Unido). El fundamento básico del programa es detectar las diferencias entre los picos de elución por superposición de ellos. Los cromatogramas que se representan en el programa son bidimensionales representando la relación masa/carga (m/z) frente al tiempo de retención. Una vez alineados, los péptidos no se filtran y el software genera un mascot generis file (.mgf) con todos los espectros MS/MS. Éstos se buscan usando SEQUEST (Proteome Discoverer v1.4, ThermoFisher) con los siguientes parámetros: tolerancia de selección de los precursores e iones producto de 20 ppm y 0,6 Da respectivamente, un *missed cleavage* de tripsina como máximo, carbamidometilación de cisteínas como modificación fija (+57 Da) y oxidación de metioninas como modificación dinámica (+16 Da). La base de datos utilizada fue Homo Sapiens (18_05). Los resultados fueron filtrados aplicando un FDR máximo del 1% y rango peptídico de 1. Una vez procesado, los resultados se importaron otra vez a Progenesis QI para su posterior análisis.

Finalmente, se realiza el test estadístico ANOVA considerando que una proteína es diferencial cuando presenta al menos dos péptidos, un $FC > 1,4$ (estudio del proteoma de VEs) y un $FC > 1,25$ (estudio del fosfoproteoma plaquetario) y un $p < 0,05$.

3.7.2.4.3 Análisis de proteómica dirigida mediante Skyline

Para validar los resultados de fosfoproteómica, se seleccionaron varias proteínas de interés dada su relevancia en activación y agregación

plaquetaria. Los experimentos de proteómica dirigida se basan en un número más reducido de proteínas seleccionadas antes de realizar el experimento.

Se diseñó la lista con los péptidos fosforilados de interés que se querían analizar. Una vez obtenidos los resultados, se analizaron mediante Skyline (175) calculando el área bajo la curva de cada uno de los iones de fragmentación (los 3 iones más abundantes).

3.8 HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS DE DATOS

3.8.1 Bases de datos

Con el fin de analizar los datos obtenidos mediante los estudios proteómicos, se consultaron diferentes bases de datos que ofrecen una información detallada y actualizada de las proteínas identificadas, se recogen las bases de datos utilizadas en la siguiente tabla:

Tabla 11: Bases de datos utilizadas en los diferentes estudios proteómicos.

BASE DE DATOS	REFERENCIA
PubMed (National Center for Biotechnology Information, NCBI), National Library of Medicine, MD, EEUU	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Universal Proteina Resource, UniProt®	https://www.uniprot.org/
EVpedia	(176)
PhosphoSitePlus ®	(177)
Vesiclepedia	(178)
Platelet web	(179)

3.8.2 Programas de biología de sistemas

Para determinar las potenciales interacciones entre las proteínas diferenciales identificadas, así como su función biológica y su posible participación en las diferentes vías de señalización plaquetaria, se llevó a cabo un análisis de biología de sistemas con diferentes programas. Entre ellos se encuentran: Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity Systems, CA, EEUU), Funrich (180) y Cytoscape (181) este último con diferentes herramientas como Wikipathways y STRING (182).

3.9 ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

3.9.1 Activación plaquetaria

Las activaciones se llevaron a cabo con el fin de evaluar la alteración de una vía de señalización específica, en este caso la de GPVI en los pacientes obesos. Para ello se utilizó un agonista específico CRP-XL que contiene la región GPO necesaria para la unión con el receptor. Las activaciones se realizan en el agregómetro mediante un procedimiento similar al descrito anteriormente en los estudios de agregación. Los estudios de activación se realizan en condiciones no agregantes, por lo que se añaden a las muestras un inhibidor de la vía de señalización de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, conocido como eptifibatida (Integrilin®).

Se añaden 9 μM de Integrilin® a una suspensión de plaquetas (500 μl a 8×10^8 plaquetas/mL) y se incuban durante 10 min, 5 min a temperatura ambiente y otros 5 min en agitación en el equipo. Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra se somete a 1 min de

agitación en el agregómetro a 37°C. Posteriormente, se añade el agonista a la concentración deseada (1µg/mL) y se incuba durante el tiempo óptimo de activación previamente establecido, en el caso del CRP-XL son 90 s. Una vez transcurrido el tiempo, las plaquetas se lisan con el tampón de lisis 2X, suplementado con inhibidores de proteasas.

3.9.2 Inmunoprecipitación de fosfotirosinas (4G10)

Para poder determinar el grado de alteración de la vía de GPVI, las muestras activadas con CRP-XL se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10, Millipore, USA). El fundamento básico de esta inmunoprecipitación es la unión del anticuerpo a los residuos fosforilados en tirosina de las proteínas. El protocolo realizado fue el siguiente:

- Previo a la inmunoprecipitación, se realiza un paso previo de preaclorado a las muestras. Se añaden unas bolitas de sefarosa recubiertas de proteína A (PAS). Para ello se preparan alrededor de 250 µL (50% v/v) de PAS con TBS-T y se incuban 25 µL de PAS en 500 µL la suspensión de plaquetas lisadas con tampón de lisis (NP-40) durante 1h a 4°C en rotación. Esto se realiza para eliminar posibles impurezas de la muestra que interaccionen de manera inespecífica con el anticuerpo.
- Transcurrida la hora, se centrifugan 10 min a 10.000g a 4°C y se transfiere el sobrenadante a otro tubo donde se le añadirá el

anticuerpo anti-fosforitosina 4G10. Se añaden 5 µg de anticuerpo a las muestras y se deja en rotación toda la noche a 4°C.

- A la mañana siguiente, se centrifugan las muestras durante 2 min a 10.000g. Todas las centrifugaciones se realizan a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se realizan tres lavados de 1 mL, el primero con tampón de lisis 2X, y los otros dos con solución salina tamponada con tris (TBS-T).
- Finalmente, las muestras se lisan con el tampón de carga 2X (Laemli), se mezcla bien y se hierven durante 5 min en el termobloque. Se recogen en un tubo nuevo después de centrifugar 2 min a 10.000g evitando coger las bolitas del fondo del tubo.

3.9.3 Inmunodetección de proteína

Durante esta tesis doctoral, la inmunodetección de proteína para las validaciones de las proteínas de interés se realizó en geles pequeños de poliacrilamida al 11%. En algunos casos y dependiendo del estudio las validaciones se hicieron en electroforesis monodimensional o bidimensional. La diferencia es que en la bidimensional hay un paso previo de isoelectroenfoque donde la muestra se precarga en las tiras IPG de 7 cm con un intervalo de pH 4-7 (explicado en el **apartado 3.7.1.3**). Una vez acabado el isoelectroenfoque, las muestras proteicas se separan en el sistema XCell SureLock (Invitrogen).

Después de la separación electroforética mencionada en el **apartado 3.7.1.1**, se procede a la transferencia de las proteínas a

membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) utilizando un sistema húmedo XCell II™ Blot Module acoplado a la cubeta XCell SureLock™ Mini-Cell. El protocolo es el siguiente:

Los geles se lavan durante 5 min en tampón de transferencia para eliminar los restos del tampón de electroforesis.

En el sistema XCell II™ Blot Module se realiza la transferencia a 200 mA a 4°C durante 2 h. Una vez la muestra ha sido transferida a la membrana, esta se lava durante 5 min con TBS-T y se bloquea durante toda la noche con una solución de bloqueo.

Al día siguiente, se procede a la incubación de la membrana con los anticuerpos primarios correspondientes durante 90 min. La lista de anticuerpos utilizados se recoge en la **Tabla 12**. Todo el proceso se realizará a temperatura ambiente y en agitación.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavan las membranas 3 veces con abundante TBS-T durante al menos 10 min, y se añade el anticuerpo secundario correspondiente utilizando una dilución 1:5.000 en TBS-T. El anticuerpo secundario se incubará durante 60 min en agitación.

Una vez acaba la incubación con el anticuerpo secundario, se lavan las membranas 3 veces y se procede a la detección de las bandas. Se añaden 2mL de sustrato Pierce ECL Western Blotting por membrana y se deja incubar durante 2 min. Posteriormente, se realiza el revelado mediante placas radiográficas Amersham Hyperfilm ECL utilizando líquidos de revelado y fijación Agfa.

Tabla 12: Lista de anticuerpos utilizados en esta la tesis doctoral

ANTICUERPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCIÓN
Fosfo-Src (Y419)	Invitrogen	44-660G	1:1,000
Sar pan	Invitrogen	44-656G	1:1,000
Integrina α IIb	Santa Cruz Biotechnology	sc-15328	1:500
GAPDH	Sigma-Aldrich	G9545	1:5,000
Complemento C3	Santa Cruz Biotechnology	sc-28294	1:500
Fibrinogeno	Santa Cruz Biotechnology	sc-69775	1:1.000
Flotilin-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-74566	1:100
CD9	Santa Cruz Biotechnology	sc-9148	1:1,000
PLC γ 2	Santa Cruz Biotechnology	sc-5283	1:500
G6F	CovalAB UK	-	1:500
IgG anti-raton	Pierce (Thermo Scientific)	31460	1:5,000
IgG anti-conejo	Pierce (Thermo Scientific)	31430	1:5,000

3.10 MEDIDA DE LOS NIVELES DE GPVI SOLUBLE Y MARCADORES DE INFLAMACIÓN EN PLASMA

El receptor específico para colágeno y fibrina, GPVI, se encuentra en las plaquetas circulantes en los individuos sanos, pero se libera en condiciones de activación plaquetaria, elevada tensión por rozamiento,

o por activación del factor X. El dominio extracelular que se libera es conocido como GPVIs y está compuesto por un hectodominio de 55 kDa. La medición de este compuesto se realizó en colaboración con la Prof. Elizabeth Gardiner del Dept. Cancer Biology and Therapeutics. John Curtin School of Medical Research, The Australian National University, Canberra, Australia.

Para la obtención de las muestras de plasma, éstas se procesan de la misma manera que el aislamiento de PFP (**apartado 3.4**). Los niveles de GPVIs se midieron a través de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) en muestras las muestras de PFP (183).

3.11 ESTUDIO PILOTO DE LOS LÍPIDOS

Durante los últimos años, el interés por el estudio de perfil lipídico de las plaquetas ha crecido exponencialmente. La caracterización de fosfolípidos de membrana, eicosanoides, y lípidos neutrales como el colesterol y triglicéridos en las plaquetas ha permitido que lipidoma plaquetario sea un tesoro oculto como fuente de biomarcadores para diagnóstico y pronóstico de enfermedades tales como las cardiovasculares. El objetivo de este estudio preliminar fue el análisis de lípidos, tanto lípidos neutros como fosfolípidos, que variaran entre grupos con el fin de encontrar posibles biomarcadores relacionados con el riesgo a sufrir enfermedades cardiovasculares en obesidad. Este estudio se hizo en colaboración con el Profesor. Bernard Payrastre del

*Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC),
Toulouse, Francia.*

3.11.1 Aislamiento de plaquetas

El estudio se realizó con un total de 9 obesos mórbidos y sus controles delgados pareados por edad y sexo. Siguiendo el protocolo, las plaquetas se aislaron mediante el método descrito en el **apartado 3.2**.

- Tras la última centrifugación realizada para aislar las plaquetas, y tras el reposo de las mismas durante 30 min, a 2×10^8 plaquetas se añade 2,5µL de EGTA (concentración final 1mM) durante 5 min.
- Posteriormente, se centrifugan durante 10 min a 1,000g en una centrifuga de ángulo fijo.
- El sobrenadante se aspira con cuidado y el pellet de plaquetas se congelan mediante el empleo de nitrógeno líquido.
- Las muestras previamente congeladas se guardan a -80°C hasta su procesamiento.

3.11.2 Homogenizado de las muestras

Las plaquetas se homogenizan con *FastPrep*®-24 *Instrument* (MP Biomedical) en 500 µL de un tampón que contenía 2:1 (v/v) de metanol y agua con 5mM EGTA. Inmediatamente después del homogenizado, 50 µL de la muestra se separa para cuantificación proteica.

3.11.3 Extracción de lípidos: fosfolípidos, ceramidas, esfingolípidos y lípidos neutrales

Los lípidos procedentes de la mitad del homogenizado fueron extraídos basándose en el estudio de Bligh y colaboradores (184). La muestra se mezcló con un tampón compuesto por diclorometano/metanol (2% ácido acético)/agua usando las siguientes proporciones: 2,5:2,5:2 y en presencia de los estandars internos: (Ceramida (Cer) d18:1/15:0 16 ng; Fosfatidiletanolamina (PE) 12:0/12:0 180 ng ; Fosfatidilcolina (PC) 13:0/13:0 16 ng ; esfingomielina (SM) d18:1/12:0 16 ng ; Fosfatidilinositol (PI) 16:0/17:0 30 ng ; PS 12:0/12:0 156.25 ng, 4 µg de Estigmasterol, 4µg de Colesterol heptadecaonoato y 8 µg de Gliceril trinonadecanoato).

Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 3 min a 1,500 rpm en una centrifuga de ángulo fijo. La fase orgánica se recolectó y se llevó a sequedad mediante nitrógeno líquido. Una vez seca, se añadieron 20 µL de etilacetato para el análisis de los lípidos neutros o 50 µL de CH₃OH para el estudio de los fosfolípidos y esfingolípidos. Las muestras fueron guardadas a -20°C hasta su análisis.

3.11.4 Perfil lipídico de los fosfolípidos, ceramidas y esfingolípidos

Para estudiar el perfil lipídico de los fosfolípidos y esfingolípidos se utilizó un sistema Agilent 1290 UPLC acoplado a un espectrómetro de masas G6460 triple cuadrupolo (Agilent Technologies). La adquisición y análisis se realizó mediante el software MassHunter. La columna

utilizada para separar las muestras mediante LC fue Kinetex HILIC (Phenomenex, 50 x 4.6 mm, 2.6 μ m). La fase móvil (A) contenía acetonitrilo y la fase B contenía 10mM de formato amonio en agua a un pH de 3.2. El gradiente que se llevó a cabo fue el siguiente: de 10% al 30% de la fase B durante 10 min; 100% de la fase B durante 10-12 min y posteriormente se volvió al 10% de la fase B para el reequilibrado de la columna utilizado en la siguiente inyección.

Los parámetros de fase móvil fueron: ratio de flujo 0.3 mL/min y el volumen de inyección 5 μ L. En cuanto a la fuente de electrospray se utilizó de modo ion positivo para el análisis Cer, PE, PC y SM y negativo para el análisis de PI y PS. El gas de colisión utilizado fue el nitrógeno y el voltaje de la aguja fue de +4,000V.

En cuanto al análisis, diferentes métodos se llevaron a cabo. Para obtener las diferentes especies de masas naturales, se analizaron los extractos de lípidos con un ion precursor de 184 m/z, 241 m/z y 264 m/z para PC/SM, PI y Cer, respectivamente. Por otro lado, también se analizaron los lípidos neutrales con iones precursores de 141 (PE) y 87 (PS). La colisión óptima para cada uno de los lípidos fue la siguiente: Cer, PE, PC, SM, PI, PS fue 25 eV, 20 eV, 30 eV, 25 eV, 45 eV, y 22 eV, respectivamente. Una vez analizado, las transiciones SRM se utilizaron para cuantificar las diversas especies de fosfolípidos de cada clase. Se necesitan dos adquisiciones MRM dado que es importante para las diferencias entre grupos de fosfolípidos. Todos los resultados

fueron analizados mediante un programa de análisis cuantitativo (vB.05.00) y cualitativo (vB.04.00).

3.11.5 Perfil lipídico de los lípidos neutros

Se analizó 1 μ L del extracto lipídico mediante cromatografía de gases tuvo lugar en un sistema FOCUS Thermo Electron usando el equipo Zebron-1 Phenomenex fusionado con una columna de capilaridad (sílica) (5m X 0,32mm i.d, 0.50 μ m de espesor de la película) (185). La temperatura se programó de 200°C a 350°C con un ratio de 5°C por minuto y el gas portador fue hidrogeno (0,5 bar). Por último, el inyector y el detector se encontraban a 315°C y 345°C, respectivamente.

3.12 MODELO ANIMAL: OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA EN RATAS

En línea con los estudios en humanos, se llevó a cabo la puesta a punto de un modelo de obesidad inducida por dieta (DIO) en ratas. El modelo de obesidad en ratas es un modelo bien establecido y reconocido en la investigación endocrina. Sin embargo, el estudio con ratas no es tan utilizado en la investigación de plaquetas. Por ello, el objetivo de este estudio fue desarrollar un modelo animal de referencia para el estudio de plaquetas en obesidad y a su vez, correlacionar con los resultados obtenidos en humanos.

3.12.1 Aspectos éticos de animales de experimentación

Los procedimientos realizados con animales fueron llevados a cabo bajo la supervisión del Comité bioético de la Universidad de Santiago de Compostela, procedimiento de la Profesor Felipe F. Casanueva con código del proyecto 15005/2015/003. y siguiendo la normativa vigente:

- Ley estatal 32/2007 del 7 de noviembre, relativa al cuidado de los animales, su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- Decreto 296/2008 del 30 de diciembre, relacionada con la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios, así como la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de Experimentación.
- Directiva 2010/53/UE del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de septiembre, adoptaron la Directiva 2010/63/UE, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- Real decreto 53/2013 del 6 de junio, en el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- Orden ECC/566/2015 del 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir

el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

A su vez, para realizar esta investigación me he acreditado con el certificado de reconocimiento de la capacitación de manejo de animales, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo docencia (Especie roedores, Orden ECC/566/2015)

Durante el desarrollo de este trabajo se han tenido en cuenta el bienestar animal, intentando reducir el estrés, el dolor o el daño duradero en los animales. De acuerdo con artículo 4 del real decreto 53/2013, se implementa el Principio de las “3 erres”, es decir, reemplazo, reducción y refinamiento de los procedimientos. De esta manera, se ha intentado reducir el número de experimentos realizados con animales y evitando el uso innecesario de animales dentro de los mismos, sin que afecte o comprometa el resultado de los experimentos.

3.12.2 Diseño experimental

Para el estudio se solicitaron cuarenta ratas macho adultas especie Sprague-Dawley (150-199g) se solicitaron al Animalario Central de la *Universidad de Santiago de Compostela*. Estas ratas se encontraban en el estuario bajo temperaturas controladas (22-24°C), ciclos luz/oscuridad de 12h y acceso libre a comida y agua. Para el experimento, las ratas se estabularon en el animalario del CIMUS (sala

convencional, número de registro REGA ES150780275701) bajo las mismas condiciones previamente descritas.

Después de 7 días de aclimatación, los animales fueron separados de manera aleatoria en dos grupos experimentales (n=20/grupo): control y DIO. En el grupo DIO, los animales fueron alimentados con una dieta alta en grasa (D12492; grasa 60% kilocalorias (kcal), proteínas 20% kcal, carbohidratos 20% kcal, Research Diets, NJ) mientras que el grupo control fue alimentado con una dieta estándar (D12450B; 10% grasa, Research Diets, NJ). Ambos grupos fueron alimentados ad libitum durante 9 semanas. Se midieron parámetros como la ingesta (gr de comida ingerida) y el peso corporal (gr) semanalmente. Asimismo, se midieron los niveles de glucosa en sangre una semana antes de la eutanasia mediante una incisión en la cola. Para la medición de la glucosa se utilizó tiras reactivas Accu-chek Performa CT STRIP y un lector Accu-chek Performa (Roche). El procedimiento se detalla de manera gráfica en la **Figura 10**.

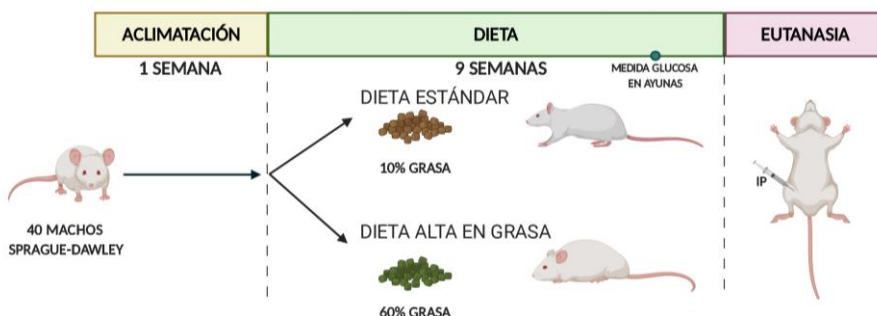


Figura 10: Diseño experimental con el modelo animal de obesidad inducida por dieta

3.12.3 Extracción de sangre

Los animales fueron eutanasiados intraperitonealmente mediante una mezcla de Ketamina/Xilacina (KETAMIDOR (100 mg/mL, Richter pharma ag) y ROMPUN (Xilacina, 20mg/mL Bayer)). Una vez los animales no respondían a ninguno de los estímulos visuales, auditivos y a los reflejos, se procedió a la extracción de sangre. Durante la puesta a punto se realizaron diferentes aproximaciones como punción cardíaca y vena cava para conseguir un protocolo óptimo de extracción en el que se consiguiera gran cantidad de sangre y se evitara la activación espontánea de plaquetas por manipulación. La extracción se realizó por la vena cava visible que se encuentra en forma de triángulo detrás del intestino, encima de los riñones. Además, también se probaron agujas con diferente calibre y jeringas para poder determinar cuál podía tener las características necesarias para evitar una activación espontánea por rozamiento. Finalmente, la extracción óptima se consiguió con jeringas de 10 mL con agujas del calibre 21G.

Se desarrolló un procedimiento de extracción de sangre detallado evitando la coagulación y la activación plaquetaria espontánea. El protocolo fue el siguiente:

- Antes de la extracción, la jeringa se precarga e impregna con 1mL de citrato sódico con una aguja de 20G.
- Una vez visualizada la vena cava, se clava la aguja con el bisel hacia arriba y lo más paralelo posible a la vena. Una vez clavada, se alza unos 20° para que la sangre empiece a fluir.

- El émbolo de la jeringa se tiene que sujetar de manera fija evitando cualquier movimiento que pueda hacer que entre el aire en la jeringa. Si es así, la extracción se tendrá que parar ya que la sangre podría coagular y alterar por tanto los resultados.
- Se finaliza la extracción cuando ya no fluye la sangre de manera continua o la jeringa está completa (alrededor de 8 mL/rata).

3.12.4 Aislamiento de plaquetas de rata

El protocolo de aislamiento de plaquetas en rata, se elaboró a partir de una guía práctica de muestras de ratón llevada a cabo por Aurbach y colaboradores (186). Se realizaron diferentes modificaciones teniendo en cuenta la complejidad de la muestra y el tamaño de las plaquetas en rata. El protocolo en detalle se muestra a continuación:

- Se preparan tubos de 2 mL con 150 μ L de ACD (precalentado) y se añade la sangre hasta llegar alrededor de 1,5 mL. Se centrifugan los tubos durante 15 min a 200g en una centrifuga de ángulo fijo.
- Una vez acabada la centrifugación, se dejan los tubos en reposo vertical durante 5 min permitiendo que se separen bien las fases para evitar contaminaciones de glóbulos rojos.
- Una vez se produce esa separación, se traspasa la fase superior (PRP) a un tubo de 50 mL añadiendo PGI_2 (concentración final 1mg/mL). Se vuelve a centrifugar el tubo 10 min a 1.000g en una centrifuga hematológica.

- Se elimina el sobrenadante y se añaden 400µl ACD (10%) y 3.6mL MTB (90%) para posteriormente contar la suspensión de plaquetas en el Coulter. El procedimiento de conteo es exactamente igual al detallado en el **apartado 3.2**. Una vez contadas, se añade otra vez el inhibidor de la activación plaquetaria (PGI₂) y se centrifuga 10 min a 1.000g.
- Por último, se elimina el sobrenadante y se disuelve el pellet de las plaquetas a la concentración adecuada, en este caso 1×10^8 plaquetas/mL.

3.12.5 Ensayos de CMF

Se midieron el tamaño plaquetario y los niveles de contaminación de la muestra con otros tipos celulares. Para ello, se cogieron 10 µL de una solución de plaquetas (5×10^7 células/mL) y se diluyeron con 0,2 mL del diluyente (Isoton, Beckman Coulter, USA). Los parámetros se midieron mediante CMF en un citómetro Acurri C6 (BD bioscience) y en duplicado.

3.12.6 Estudios funcionales y bioquímicos en el modelo animal de rata

Una vez puesto a punto la extracción y el aislamiento de plaquetas, la sangre se aprovechó para consolidar varios resultados obtenidos en humanos. Para ello, se realizaron diferentes estudios funcionales y bioquímicos con el fin de ver si las plaquetas de las ratas obesas

presentan alteraciones en las principales vías de señalización como la del receptor de colágeno GPVI y del fibrinógeno, la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$.

Adhesión estática en placa

Para la adhesión se utilizaron diferentes ligandos: Horm Colágeno y Fibrinógeno de rata (Enzyme Research Laboratories, Inc., USA). En la misma placa se midió la adhesión de la rata DIO y su control pareado por edad y sexo. Durante el estudio, se midió la adhesión de las plaquetas de un total de 24 ratas. El protocolo que se utilizó fue el mismo que el usado en plaquetas de humanos y se encuentra detallado en el **apartado 3.3.4**.

Inmunodetección

En el caso de la inmunodetección, se decidió investigar los niveles de un posible biomarcador plaquetario en obesidad. Dado que existe una gran variabilidad de peso entre grupos, se decidió seleccionar grupos extremos, es decir, aquellas ratas que presentaban valores de peso/glucosa más elevados en el grupo obeso y menores en el grupo control.

Siguiendo el protocolo detallado en el **apartado 3.9.3**, se cargaron un total de 5 μg de proteína por muestra. Posteriormente, las membranas se incubaron con la forma activa de la proteína SRC, fosfo-Src en el residuo Y419 y como control de carga la proteína sin fosforilar (Src pan).

3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 7 (GraphPadSoftware, La Jolla, CA, EEUU). Para conjunto de datos se realizó un análisis de valores atípicos (outliers) aplicando el método ROUT. En el caso de identificar algún valor atípico, se eliminó la muestra correspondiente de todos los análisis.

Para los estudios proteómicos, se utilizó el estadístico ANOVA para calcular el valor p en cada una de las manchas proteicas utilizando los volúmenes cuantificados y normalizados de cada una de las imágenes del análisis (Progenesis SameSpots y Progenesis QI). Los valores de probabilidad empleados fueron en todos los casos de dos colas, considerando estadísticamente significativos aquellos con un $p < 0,05$

Previamente a los análisis comparativos entre grupos, tanto en humanos como en el modelo animal, se realizó en todos los casos un análisis de normalidad aplicando el test Shapiro-Wilk. Una vez analizado el ajuste de los datos a una distribución Gaussiana, se procede con el test de comparación de dos muestras dependiendo si se ajusta a la distribución o no. En el caso de que los datos se ajusten a una distribución normal se realiz el t-student (test paramétrico). Sin embargo, para aquellos que no se ajustan a distribución Gaussiana, se aplicó el test no paramétrico Mann Whitney.

Las correlaciones lineales se realizaron con el test Spearman o Pearson dependiendo si los datos se ajustan o no la distribución

Gaussiana. Por otro lado, también se realizaron curvas ROC para determinar la potencia que tienen los resultados a la hora de separarse entre los dos grupos. Los gráficos presentados también se generaron, en su totalidad, con esta herramienta informática.





4. RESULTADOS



4.1 ESTUDIO DE LAS PLAQUETAS Y SUS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN PACIENTES CON OBESIDAD

Los pacientes con obesidad presentan un estado proinflamatorio y protrombótico favoreciendo al desarrollo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Por ello, el objetivo principal de este primer estudio fue analizar en profundidad posibles alteraciones en vías de señalización plaquetaria en pacientes obesos para obtener potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas de riesgo aterotrombótico. Para llevar a cabo el estudio, se utilizó una combinación de aproximaciones proteómicas, bioquímicas y funcionales.

4.1.1 Característica de los pacientes

Se recogieron un total de 50 pacientes con obesidad mórbida ($IMC > 40$) en el *Servizo de Endocrinoloxía* de la *Xerencia de Xestión Integrada* de Santiago de Compostela. Los obesos fueron comparados con un grupo de donantes delgados ($IMC < 25$) pareados por edad y sexo.

De esa cohorte, 10 obesos y sus 10 controles delgados se incluyeron en el análisis del proteoma plaquetario mediante la técnica 2D-DIGE (**Tabla 13**). Cabe destacar que solo uno de ellos era diabético, los demás tenían los niveles normales de hemoglobina glicosilada ($HbA1c < 6,5\%$). El estudio del fosfoproteoma se realizó con una cohorte independiente formada por 12 pacientes obesos y sus controles delgados pareados tanto por edad como por sexo (**Tabla 14**). Por último, los estudios de validación, donde se engloban estudios

funcionales, mecánicos y bioquímicos, se realizaron con la cohorte completa de pacientes con obesidad mórbida (n=50) y sus controles delgados pareados por edad y sexo (n=47).

Tal y como se muestra en las siguientes tablas, se encontraron diferencias significativas en el índice de masa corporal (IMC), como era de esperar. Además, los niveles de leucocitos eran significativamente superiores en el grupo obeso, algo esperado debido al estado proinflamatorio en el cual se encuentran en estos pacientes. Sorprendentemente, los niveles volumen plaquetario medio (VPM) se mostraban disminuidos en pacientes obesos, aunque todos los valores se encuentran en el rango fisiológico normal (**Tabla 15**).

Tabla 13: Características clínicas de los pacientes/participantes en el estudio proteómico basado en la técnica 2D-DIGE.

Variable	Controles (N =10)	Obesos (N =10)
Edad (años)	33,50 ± SD 11,30	33,50 ± SD 11,90
Mujeres (%)	90%	90%
IMC***	21,83 ± SD 1,96	46,30 ± SD 6,07
Diabetes (%)	0%	10%
Análítica		
Hemoglobina (g/dl)	13,50 ± SD 0,85	13,46 ± SD 0,71
Leucocitos/ μ L*	7,75 ± SD 6,58	8,70 ± SD 2,62
Plaquetas/ μ L	242400 ± SD 60120	255400 ± SD 60110
Volumen medio plaquetario (fL)*	8,70 ± SD 1,49	10,07 ± SD 1,60
Glucosa (mg/dl)	83,60 ± SD 8,04	83,10 ± SD 13,33
Creatinina (mg/dl)	0,72 ± SD 0,09	1 ± SD 0,01
Colesterol (mg/dl)	194,50 ± SD 37,88	175,10 ± SD 24,48

^a. Los datos se presentan con la media ± SD o el porcentaje de pacientes. * $p < 0,05$,

*** $p < 0,0001$.

Tabla 14: Características clínicas de los pacientes/participantes en el estudio fosfoproteómico basado en *label free* LC-MS/MS.

Variable	Controles (N=12)	Obesos (N=12)
Edad (años)	42,42 ± SD 10,75	44,67 ± SD 12,21
Mujeres (%)	75%	75%
IMC***	22,24 ± SD 1,64	49,50 ± SD 7,75
Diabetes (%)	0%	0%
Análítica		
Hemoglobina (g/dl)	14,06 ± SD 1,34	14,37 ± SD 1,19
Leucocitos/ μ L*	5,64 ± SD 1,27	8,30 ± SD 1,45
Plaquetas/ μ L	236300 ± SD 2184	237300 ± SD 3957
Volumen medio plaquetario (fL)*	9,76 ± SD 1,34	8,69 ± SD 1,12
Glucosa (mg/dl)	81,88 ± SD 5,81	90,36 ± SD 10,98
Creatinina (mg/dl)	0,78 ± SD 0,14	0,68 ± SD 0,17
Colesterol (mg/dl)	196,8 ± SD 43,99	202,50 ± SD 35,93

^a. Los datos se presentan con la media ± SD o el porcentaje de pacientes. * $p < 0,05$,

*** $p < 0,0001$.

Tabla 15: Características clínicas de los principales pacientes/participantes en los estudios de validación y estudios funcionales.

Variable	Controles (N=50)	Obesos (N=47)
Edad (años)	39,5 ± SD 11,32	41,25 ± SD 12,12
Mujeres (%)	82%	82%
IMC***	22,46 ± SD 1,86	46,58 ± SD 6,11
Diabetes (%)	0%	2%
Análítica		
Hemoglobina (g/dl)	13,83 ± SD 1,25	14,23 ± SD 1,02
Leucocitos/ μ L*	6,45 ± SD 3,66	8,30 ± SD 2,24
Plaquetas/ μ L*	229800 ± SD 6177	260300 ± SD 6141
Volumen medio plaquetario (fL)*	9,50 ± SD 1,38	8,73 ± SD 1,13
Glucosa (mg/dl)	83,1 ± SD 7,97	90,20 ± SD 13,96
Creatinina (mg/dl)	0,74 ± SD 0,13	0,70 ± SD 0,16
Colesterol (mg/dl)	196,8 ± SD 34,24	188,7 ± SD 32,95

^a. Los datos se presentan con la media ± SD o el porcentaje de pacientes *** $p < 0,0001$.

4.1.2 Resultados de los estudios proteómicos y bioquímicos

4.1.2.1 Estudio del proteoma plaquetario de los pacientes obesos mediante la técnica 2D-DIGE

El primer estudio proteómico se realizó mediante la técnica 2D-DIGE utilizando un rango de punto isoeléctrico específico (pI 4-7) ya que la gran mayoría de proteínas procedentes de plaquetas se encuentran distribuidas en este (187).

En cuanto al análisis diferencial, se detectaron un total de 1895 manchas por gel de las cuales 55 estaban reguladas de manera diferencial entre el grupo obeso y el grupo control (corte de *fold-change* $\geq 1,2$; p valor $< 0,05$) (**Figura 11**). De esas manchas diferenciales, 25 estaban aumentadas en pacientes obesos y 30 estaban disminuidas. Una vez hecho el análisis mediante el software SameSpots, se pudieron identificar y cortar en el gel un total de 35 manchas las cuales se llevaron a analizar por espectrometría de masas y correspondían a un total de 33 proteínas únicas, que se encuentran recogidas en la **Tabla 16**.

En relación con su función cabe destacar que 17 de las proteínas identificadas actúan en respuesta ante estrés, donde se encuentran los principales procesos biológicos como es el estrés oxidativo (ej. *heat shock protein beta-1*) y la respuesta inflamatoria (ej. *zyxin* y *lysozyme C*). Además, gran variedad de las proteínas reguladas de manera diferencial está estrechamente relacionadas con el mantenimiento de la hemostasia, agregación y desgranulación plaquetaria. Por ejemplo, el

fibrinógeno, la integrina α IIb y vinculin, todas ellas aumentadas en el grupo obeso.

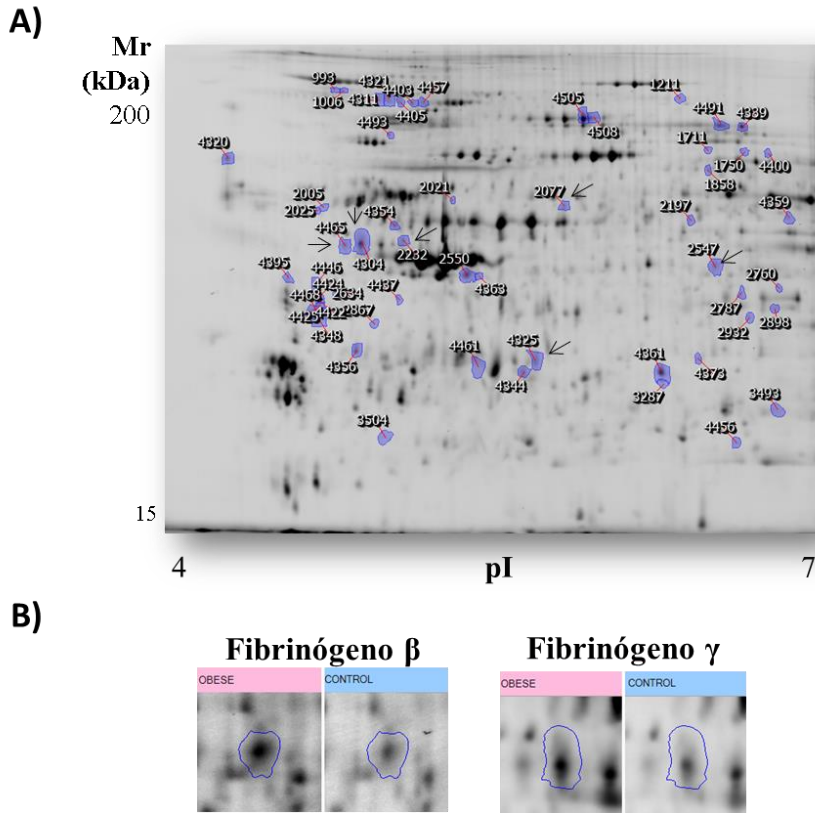


Figura 11: Análisis del proteoma plaquetario de pacientes obesos frente a controles delgados mediante la técnica 2D-DIGE. (A) Imagen representativa del análisis en escala de grises. Las manchas reguladas diferencialmente se encuentran marcadas y numeradas. (B) Imagen aumentada representativa a las manchas de fibrinógeno que se encuentran aumentados en el grupo obeso. Mr, masa molecular relativa; pI, punto isoeléctrico

Tabla 16: Estudio del proteoma plaquetario mediante 2D-DIGE: lista de proteínas identificadas que se encuentran reguladas de manera diferencial en pacientes obesos.

Código Uniprot	Nombre	Proceso Biológico	Mancha	Ratio
ACTB_HUMAN	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	Agregación plaquetaria	4405	+1.3
			4325	+1.3
			2021	+1.2
			2550	+1.2
			4461	+1.2
ACTG_HUMAN	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	Agregación plaquetaria	2550	+1.2
			4461	+1.2
ACTN1_HUMAN	<i>Alpha-actinin-1</i>	Degranulación	4465	+1.2
			4405	+1.3
			4403	+1.3
ALBU_HUMAN	<i>Serum albumin</i>	Regulación sanguínea	4424	-1.2
			4356	+1.3
ANXA5_HUMAN	<i>Annexin A5</i>	Hemostasia	4356	+1.3
ARK72_HUMAN	<i>Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2</i>	Metabolismo de los carbohidratos	2898	-1.2
DCTN2_HUMAN	<i>Dynactin subunit 2</i>	Proliferación celular	4354	-1.2
DPYL2_HUMAN	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	Endocitosis	1858	-1.2
FIBB_HUMAN	<i>Fibrinogen beta chain</i>	Agregación plaquetaria	2547	+1.2
			2077	+1.2
FIBG_HUMAN	<i>Fibrinogen gamma chain</i>	Agregación plaquetaria	4465	+1.2
			4325	+1.3
			2232	+1.3
			4304	+1.2
GELS_HUMAN	<i>Gelsolin</i>	Reorganización del citoesqueleto	4508	-1.2
			4505	-1.2
GPDM_HUMAN	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial</i>	Proceso catabólico de los lípidos	4400	-1.4
HEM2_HUMAN	<i>Delta-aminolevulinic acid dehydratase</i>	Respuesta a estrés oxidativo	2932	-1.2
HSPB1_HUMAN	<i>Heat shock protein beta-1</i>	Respuesta a estrés oxidativo	4361	-1.2
			3287	-1.2
ITA2B_HUMAN	<i>Integrin αIIb</i>	Agregación plaquetaria	993	+1.2
			1006	+1.2
LYSC_HUMAN	<i>Lysozyme C</i>	Respuesta inflamatoria	4320	-1.3

ODO2_HUMAN	<i>Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial</i>	Actividad catalítica	2077	+1.2
PDLI1_HUMAN	<i>PDZ and LIM domain protein 1</i>	Respuesta a estrés oxidativo	2782	-1.2
PDIA6_HUMAN	<i>Protein disulfide-isomerase A6</i>	Apoptosis	4354	-1.2
PGM2_HUMAN	<i>Phosphoglucomutase-2</i>	Metabolismo de la glucosa	1711	-1.2
PI42A_HUMAN	<i>Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha</i>	Metabolismo de los fosfolípidos	4359	-1.2
PP1R7_HUMAN	<i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7</i>	Proceso de fosforilación	4465	+1.2
SEPT2_HUMAN	<i>Septin-2</i>	Transporte del glutamato	2547	+1.2
SEP11_HUMAN	<i>Septin-11</i>	Ciclo celular	4359	-1.2
STIP1_HUMAN	<i>Stress-induced-phosphoprotein 1</i>	Regulación de proteínas	1858	-1.2
TBB1_HUMAN	<i>Tubulin beta-1 chain</i>	Reorganización del citoesqueleto	4354	-1.2
TPM1_HUMAN	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	Reorganización del citoesqueleto	4424 4348	-1.2 -1.2
TSP1_HUMAN	<i>Thrombospondin-1</i>	Agregación y activación plaquetaria	993 4405 4321 4311 4403	+1.2 +1.3 +1.2 +1.2 +1.3
TXNL1_HUMAN	<i>Thioredoxin-like protein 1</i>	Estrés oxidativo	2867	+1.2
TYPH_HUMAN	<i>Thymidine phosphorylase</i>	Angiogenesis	2021	+1.2
VINC_HUMAN	<i>Vinculin</i>	Agregación y activación plaquetaria	933 1006	+1.2 +1.2
VP37B_HUMAN	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 37B</i>	Diferenciación celular	2932	-1.2
ZYX_HUMAN	<i>Zyxin</i>	Respuesta inflamatoria	4491 4339	-1.2 -1.3

^a. Ratio: El ratio se representa grupo obeso frente a grupo control.

Se realizó un análisis de biología de sistemas con diferentes programas para ver las interacciones proteína-proteína y sus posibles implicaciones en diferentes procesos biológicos. El software STRING v10.5 determinó que el 50% de las proteínas sobreexpresadas en el grupo obeso están relacionadas con activación y agregación plaquetaria

(ej. actina, actinina-1, fibrinógeno, trombospondin-1 (TSP1) e integrina α IIb). Además, *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) destacó que la vía medida por integrinas era una de las vías de señalización más alteradas en pacientes obesos. Todas las proteínas diferencialmente reguladas forman parte de una red común relacionada con señalización célula-célula, función hematológica y respuesta inflamatoria (**Figura 12**).

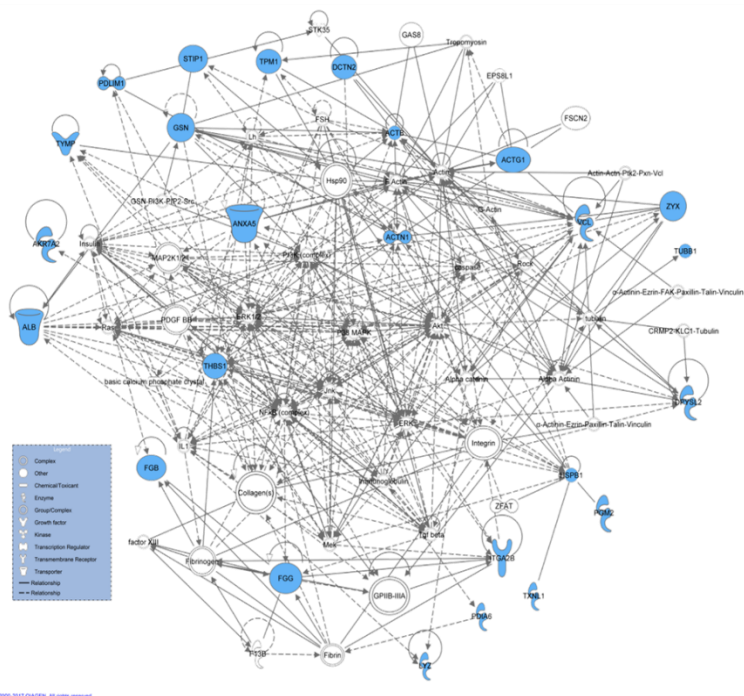


Figura 12: Estudio del proteoma plaquetario en obesidad: análisis de las proteínas mediante biología de sistemas. Las proteínas forman parte de una red común relacionada con señalización célula-célula, función hematológica y respuesta inflamatoria. Las proteínas identificadas mediante análisis diferencial se muestran como nodos sombreados en azul con el nombre de su gen. Las líneas sólidas entre nodos representan interacciones directas, las punteadas son indirectas.

4.1.2.2 Validaciones del estudio del proteoma plaquetario

Para validar el método proteómico, se seleccionó la proteína fibrinógeno dada su implicación en activación y agregación plaquetaria. El fibrinógeno está compuesto por tres cadenas distintas (α , β y γ). En el análisis proteómico la presencia de dicha proteína se encontraba en un total de 7 manchas; 2 correspondientes a la cadena β y 5 a la cadena γ . Para poder diferenciar las diferentes cadenas de la proteína, los resultados se validaron mediante inmunodetección bidimensional. Se utilizaron *pools* de 22 individuos (obesos frente delgados) y las muestras se corrieron en triplicado. En línea con los resultados de proteómica, se observó que los niveles de fibrinógeno se encuentran aumentados en las plaquetas de los pacientes obesos (**Figura 13**).

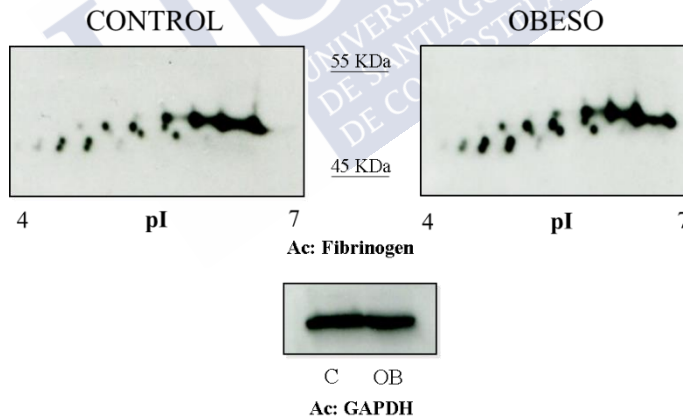


Figura 13: Validaciones por inmunodetección: los niveles de fibrinógeno están aumentados en las plaquetas de los pacientes obesos. Imagen representativa de la inmunodetección de fibrinógeno. Las muestras fueron pools de 22 individuos obesos frente a 22 controles delgados. Como control de carga se utilizó GAPDH. Los experimentos se realizaron en triplicado. Ac: anticuerpo, OB: paciente obeso, C: control delgado

4.1.2.3 Estudio de la forma activa de p-Src

Puesto que los resultados obtenidos en el estudio proteómico ponen de manifiesto la sobreexpresión de proteínas como la integrina α IIb, fibrinógeno, actinin-1 y vinculin, y la alteración de las vías mediadas por las integrinas en pacientes obesos, se decidió estudiar la posible implicación de las vías de señalización mediadas por las SFK en obesidad.

Src es una tirosina quinasa de 60 kilodalton (KDa) involucrada en transmitir las señales de activación de un gran repertorio de receptores plaquetarios como la integrina α IIb β 3, receptores ITAM como el receptor GPVI y CLEC-2, y el complejo GPIb-IX-V, todos esenciales para el crecimiento y la estabilidad del trombo (57).

Tanto Src como otros miembros de la familia de las SFKs están regulados por fosforilaciones en tirosina. De hecho, es necesaria la fosforilación de la tirosina 419, localizada en el dominio catalítico, para obtener la actividad máxima de la proteína. En este caso, se analizó mediante un anticuerpo específico los niveles forma activa de Src. El estudio se realizó con una cohorte de 29 pacientes obesos comparado con el grupo control pareado por edad y sexo. Los resultados demuestran que existe un aumento significativo de los niveles de fosforilación en el residuo Tir⁴¹⁹ de Src (forma activa) en el grupo de pacientes obesos (**Figura 14**).

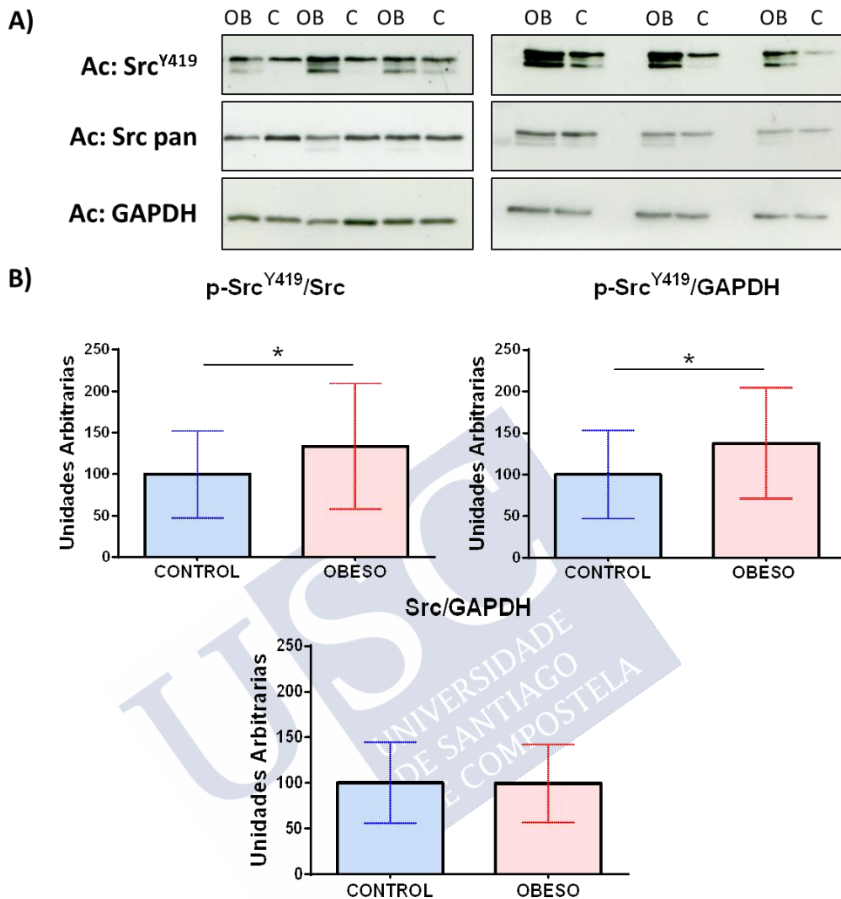


Figura 14: Inmunodetección de la forma activa de Src: Src^{Y419} se encuentra sobreexpresada en pacientes obesos. (A) Imagen representativa, obtenida mediante inmunodetección, de los niveles de expresión de p-Src^{Y419}, Src total y GAPDH. (B) Gráficos densitométricos representando la intensidad media de las bandas, el error estándar y el análisis estadístico (Test Mann Whitney) de p-Src^{Y419} corregido por Src total y el control de carga (GAPDH), los p valores son de 0,037 y 0,024 respectivamente (n=29). Además, se muestran los niveles de Src total corregidos por el control de carga (p= 0,97, n=29)). Ac: anticuerpo, OB: paciente obeso, C: control delgado.

4.1.2.4 Estudio de la vía del receptor de colágeno GPVI mediante inmunoprecipitación

Los resultados anteriores apuntan a una posible alteración de las vías de señalización mediadas por las SFK. Una vía principal mediada por SFK es la del receptor de colágeno, GPVI, el cual además se ha visto alterado en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación ST (IAMCEST) en estudios llevados por nuestro grupo de investigación (188).

Con el fin de complementar los resultados anteriores y obtener más información acerca de una posible alteración de GPVI en obesidad, se analizaron las plaquetas estimuladas con un ligando específico de GPVI (CRP-XL, 1µg/mL durante 90 s) en un subgrupo de pacientes. Dado que la vía de señalización está mediada por fosforilaciones en tirosina, posteriormente se analizaron los niveles de fosforilación de PLCγ2, proteína clave en la vía de GPVI. Además, cabe destacar que esta proteína ya se vio previamente alterada en el estudio con pacientes IAMCEST (188).

Para obtener las proteínas fosforiladas, las muestras se inmunoprecipitaron con un anticuerpo específico que se une a los residuos en tirosina (4G10 antifosfotirosinas), y posteriormente se determinaron los niveles de PLCγ2 por inmunodetección. Como se muestra en la **Figura 15**, los niveles de fosforilación de PLCγ2 en el grupo obeso eran significativamente mayores que en el grupo control (**Figura 15**). Esto sugiere que existe una hiperactivación de la vía de

señalización de GPVI en línea con los resultados obtenidos en los apartados anteriores.

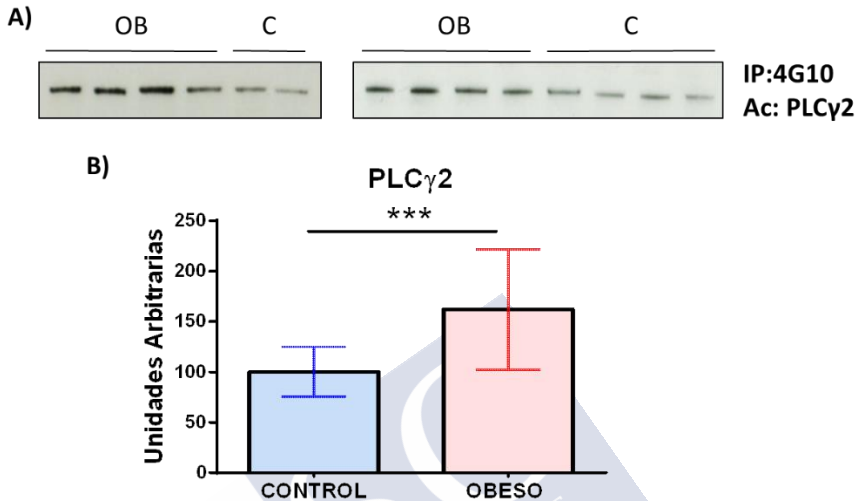


Figura 15: Los niveles de fosforilación de PLCγ2 se encuentran aumentados en las plaquetas de los pacientes obesos previamente estimuladas con CRP-XL. (A) Imagen representativa obtenida mediante inmunodetección, de los niveles de expresión de PLCγ2 después de estimular las plaquetas con CRP-XL (1μg/mL, 90s) e inmunoprecipitar con el anticuerpo 4610. (B) Gráfico densitométrico representando la intensidad media de las bandas, el error estándar y el análisis estadístico (T-Test), el p-valor es de 0,0001 (n=12). IP: inmunoprecipitación, Ac: anticuerpo, OB: paciente obeso, C: control delgado.

4.1.2.5 Estudio del fosfoproteoma de las plaquetas de pacientes obesos mediante la técnica de *label-free* LC-MS/MS

Durante los últimos años, la fosfoproteómica se ha convertido en una herramienta muy importante para estudiar los eventos de señalización celular. Dado que la plaqueta no tiene núcleo, las modificaciones post-traduccionales (PTMs), especialmente las

fosforilaciones/defosforilaciones, tienen especial relevancia en los eventos moleculares que dan lugar tras su activación.

En ese contexto, se estudió en profundidad el proteoma fosforilado de las plaquetas en reposo mediante el enriquecimiento de los fosfopéptidos con TiO_2 donde se identificaron diferencias en residuos de serina (Ser), treonina (Tre) y tirosina (Tir). Ello ofrecerá un perfil proteómico global del estado de activación de las plaquetas en pacientes obesos.

4.1.2.5.1 Estudio del fosfoproteoma plaquetario en obesidad mediante el enriquecimiento con TiO_2 .

Puesto que el interés de este segundo estudio proteómico era identificar de manera global los niveles de fosforilación de plaquetas de los pacientes obesos en un estado de reposo, el análisis fosfoproteómico se centró en los péptidos enriquecidos en Ser, Tre, Tir. El procedimiento que se siguió fue el siguiente: las muestras fueron digeridas mediante la técnica L-FASP, los péptidos fueron enriquecidos mediante óxido de titanio y posteriormente se analizaron mediante LC-MS/MS. En total, se estudió el proteoma fosforilado de la misma cantidad de proteína obtenida de 12 pacientes obesos y 12 controles delgados (4 *pools* de 3 individuos cada uno) pareados por edad y sexo.

En total, se identificaron 964 péptidos fosforilados correspondiendo al menos con 560 proteínas únicas. De esos péptidos fosforilados, se encontraron 1,545 sitios de fosforilación de los cuales

se incluían 1,342 monofosforilados (una fosforilación por péptido), 94 difosforilados (dos fosforilaciones por péptido) y 5 trifosforilados (tres fosforilaciones por péptido). Además, se identificaron 1210, 294 y 41 residuos que estaban fosforilados en serina, treonina y tirosina, respectivamente. Cabe destacar que el mismo péptido puede ser identificado más de una vez y contener varias fosforilaciones con diferente variación entre grupos.

Posteriormente, se realizó un análisis diferencial que comparaba los péptidos fosforilados del grupo obeso y el grupo control mediante el software Progenesis QI. De acuerdo con los datos obtenidos, se describieron un total de 220 péptidos fosforilados que variaban su expresión entre grupos (corte de *fold-change* ≥ 1.25 ; *p* valor < 0.05). De hecho, todos los fosfopéptidos regulados de manera diferencial se encontraban aumentados en el grupo obeso (**Figura 16A**).

Como puede observarse en la **figura 16B**, alrededor del 22% de los sitios de fosforilación identificados se encuentran alterados en el grupo obeso, de los cuales más de la mitad de los residuos son serina, siguiendo treonina y por último tirosina (**Figura 16C**). El porcentaje de variación es tan bajo porque se están estudiando las plaquetas en un estado de reposo, esto quiere decir que todas las variaciones encontradas están directamente relacionadas con la patología.

Entre los fosfopéptidos identificados aumentados en el grupo obeso, se describieron al menos 175 proteínas (**Tabla suplementaria 1, Anexo IV**), las cuales se pueden categorizar en adaptadores (33%),

quinasas (30%) y receptores (17%) (**Figura 17A**). También se encontraron una gran variedad de GAPs (*GTPase-activating proteins*) y GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*) y proteínas de secreción.

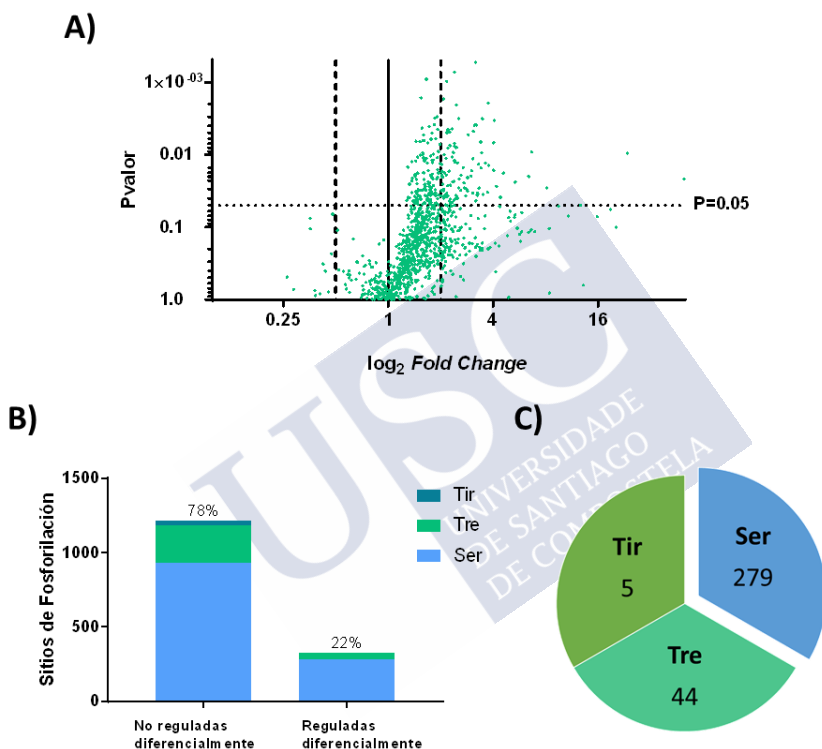


Figura 16: El análisis diferencial de los péptidos enriquecidos con TiO_2 apunta a que existe una hiperfosforilación en las plaquetas del grupo obeso. (A) El gráfico de volcán representa los cambios en abundancia de los fosfopéptidos que existen entre el grupo obeso y el grupo control. (B) El porcentaje de todos los sitios de fosforilación identificados, clasificándolos en diferencialmente regulados y no diferencialmente regulados. También se encuentran representados los residuos en serina, treonina y tirosina. (C) Diagrama mostrando el número de residuos fosforilados (serina, treonina y tirosina) diferencialmente regulados.

De hecho, la gran mayoría de estas proteínas se encuentran relacionadas con la transducción de señal una vez producida la activación plaquetaria. Además, como se puede observar en la **Figura 17B** se identificaron también proteínas que contribuyen a la reorganización del citoesqueleto, transporte de vesículas y metabolismo.

Gran parte de las fosfoproteínas identificadas de manera diferencial (aumentadas en el grupo obeso) forman parte de una red común relacionada con activación plaquetaria y transporte de vesículas (**Figura 18A**). Además, la herramienta del REACTOME (189) identificó la hemostasia como la principal vía canónica alterada seguida por el transporte mediado por vesículas, la transducción de señal y la función inmune (**Figura 18B**).

Menos del 15% de los sitios fosforilados identificados diferencialmente regulados tienen una función molecular descrita (**Tabla 17**). En línea con los resultados obtenidos en el estudio del proteoma plaquetario mediante la técnica 2D-DIGE, se encontraron una variedad de proteínas hiperfosforiladas en el grupo obeso que estaban relacionadas con las vías de señalización mediadas por las SFK (GPVI, CLEC-2 e integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$).

Entre ellas está la proteína Src^{Y419}, previamente encontrada sobreexpresada en el grupo obeso, que se identificó hiperfosforilada en el estudio del fosfoproteoma plaquetario en una cohorte diferente de pacientes. El hecho de que se encontrara la misma fosforilación alterada

siguiendo diferentes aproximaciones hace del resultado un resultado robusto y apunta a que Src^{Y419} podría ser un perfecto biomarcador de riesgo aterotrombótico en obesidad.

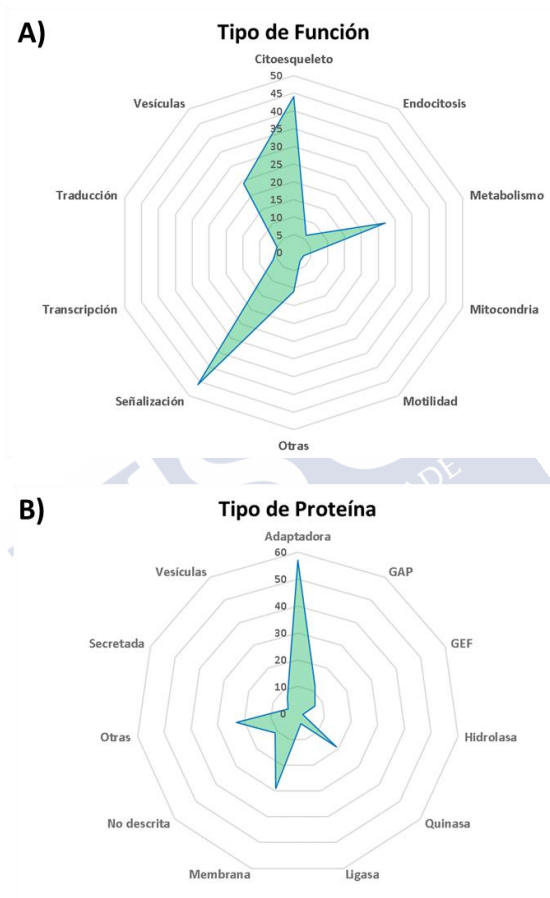


Figura 17: Los fosfopéptidos diferenciales entre plaquetas de pacientes obesos y controles delgados se corresponden mayoritariamente a proteínas adaptadoras, receptores y quinasas. Además, se encuentran relacionadas con la reorganización del citoesqueleto, transporte de vesículas y metabolismo. Los fosfopéptidos regulados de manera diferencial entre grupos se encuentran clasificados en (A) tipo de proteína y (B) tipo de función que realiza en la célula.

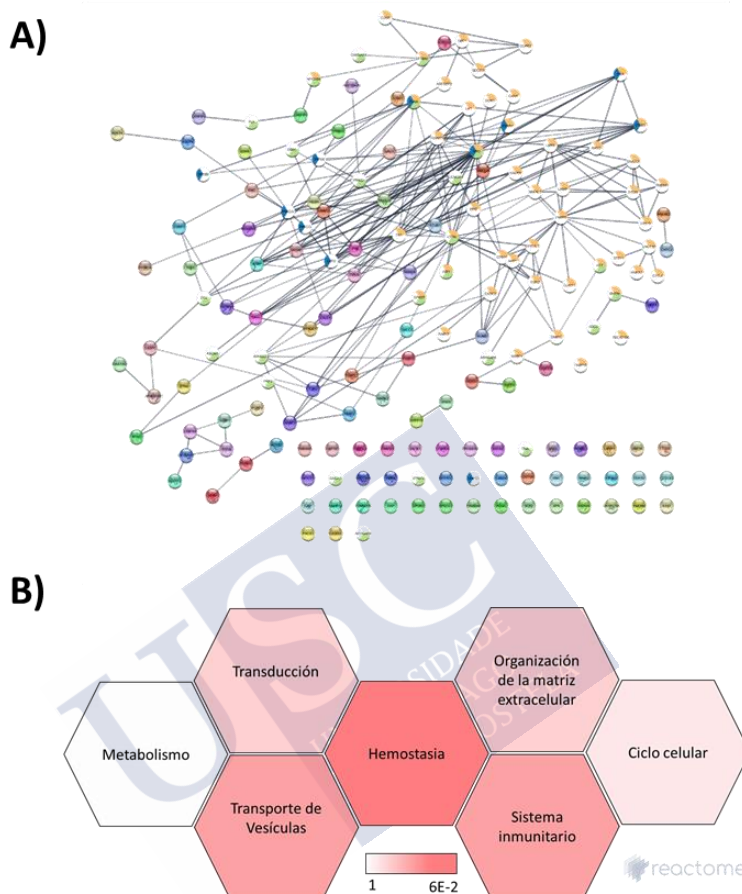


Figura 18: El análisis de biología de sistemas destaca la activación plaquetaria y el transporte de vesículas como las principales vías alteradas en obesidad. (A) Cytoscape-STRING muestra que las proteínas diferencialmente reguladas están conectadas entre si y forman parte de una misma red. (B) El análisis mediante el software REACTOME apunta a que las principales vías canónicas alteradas son hemostasia, transporte de vesículas y sistema inmune. El color de la intensidad está directamente relacionado con el False discovery rate (FDR).

Otras proteínas claves identificadas en el estudio del fosfoproteoma plaquetario que también se encuentran relacionadas con

esas vías de señalización y que además presentan una función descrita fueron: *megakaryocyte and platelet inhibitory receptor* (G6b) ^(S226 & Y237), PKC α ^{S226} and PKC θ ^(S695 & T538). En concreto, se ha descrito previamente en la bibliografía que esos sitios de fosforilación tienen actividad enzimática, asociación y regulación molecular, respectivamente.

Tabla 17: Estudio del fosfoproteoma plaquetario: lista de lugares de fosforilación identificados de manera diferencial que tienen una función descrita.

Posición PTM	Gen	Ratio	Función	Efecto
S300	PDHA1	7,87	Metabolismo	Actividad enzimática
S291	PDHA2	7,87	Metabolismo	Actividad enzimática
S298	PDHA2	7,87	Metabolismo	Actividad enzimática
S571	FYB1	4,48	Citoesqueleto	Asociación molecular / adhesión celular
S183	ABI1	3,41	Citoesqueleto	Motilidad celular, organización del citoesqueleto
S226	MPIG6B	3,31	Señalización	Regulación molecular
Y237	MPIG6B	3,31	Señalización	Regulación molecular
S488	ARHGEF6	3,20	Citoesqueleto	Crecimiento y motilidad celular
S133	EEF1D	2,78	Transcripción	Fosforilación
S695	PRKCQ	2,54	Señalización	Actividad enzimática
T538	PRKCQ	2,54	Señalización	Actividad enzimática
T508	EIF4G2	2,40	Traducción	Asociación/regulación molecular
S144	PARD3	2,34	Señalización	Regulación molecular
S51	DAP	2,26	Autofagia	Autofagia
S151	ARHGEF2	2,20	Citoesqueleto	Organización del citoesqueleto
S232	G3BP1	2,20	Señalización	Asociación/regulación molecular
S484	FERMT3	2,12	Citoesqueleto	Adhesión celular

S146	LASP1	2,08	Citoesqueleto	Regulación molecular
S216	RGS18	2,04	Señalización	Regulación molecular
S218	RGS18	2,04	Señalización	Regulación molecular
S759	CALD1	2,01	Citoesqueleto	Motilidad celular, organización del citoesqueleto
S365	BRAF	1,93	Metabolismo	Actividad enzimática
S55	VAMP8	1,83	Transporte de vesículas	Actividad inhibitoria
Y420	FYN	1,72	Señalización	Actividad enzimáticas
Y419	SRC	1,72	Señalización	Actividad enzimática
Y426	YES	1,72	Señalización	Actividad enzimática
T401	CTTN	1,68	Citoesqueleto	Localización intracelular
S226	PRKCA	1,65	Señalización	Actividad enzimática
S331	TBXA2R	1,64	Señalización	Desensibilización
S191	GPIBB	1,52	Señalización	Adhesión celular
S243	MPP1	1,52	Metabolismo	Localización intracelular
S10	DNAJC5	1,49	Transporte de vesículas	Exocitosis
S1859	CAD	1,47	Metabolismo	Actividad enzimática
S1459	FLNA	1,47	Citoesqueleto	Organización del citoesqueleto
S1084	FLNA	1,47	Citoesqueleto	Organización del citoesqueleto
S2152	FLNA	1,33	Citoesqueleto	Organización del citoesqueleto
T517	PRKG1	1,31	Señalización	Fosforilación

^a. Ratio: El ratio se representa grupo obeso frente a grupo control.

Cabe destacar que otro grupo relevante de fosfoproteínas identificadas están involucradas en la remodelación del citoesqueleto como es el caso de FLNA^{S2152&S1084}, Rho GTPases -ARHGEF2^{S151} y ARHGEF6^{S488}-, ABI1^{S183} y CALD1^{S759}. Asimismo, se han identificado otras proteínas alteradas en obesidad que están involucradas en diversas funciones biológicas, tales como autocatálisis (DYRK18^{Y273}), adhesión celular (GPIIb^{S191} y Kindlin-3^{S484}), actividad inhibitoria (VAMP-8^{S55}) y exocitosis (DNAJC5^{S10}). Así pues, considerando las diferencias

detectadas entre grupos e integrando estos resultados con el conocimiento previo sobre el papel de estas proteínas en las diferentes vías de señalización, se elaboró un esquema incluyendo una descripción detallada de los resultados. La imagen recopila los eventos moleculares que tendrían lugar a nivel intracelular en las plaquetas de los individuos obesos. Todas las interacciones identificadas están representadas en la **Figura 19.**



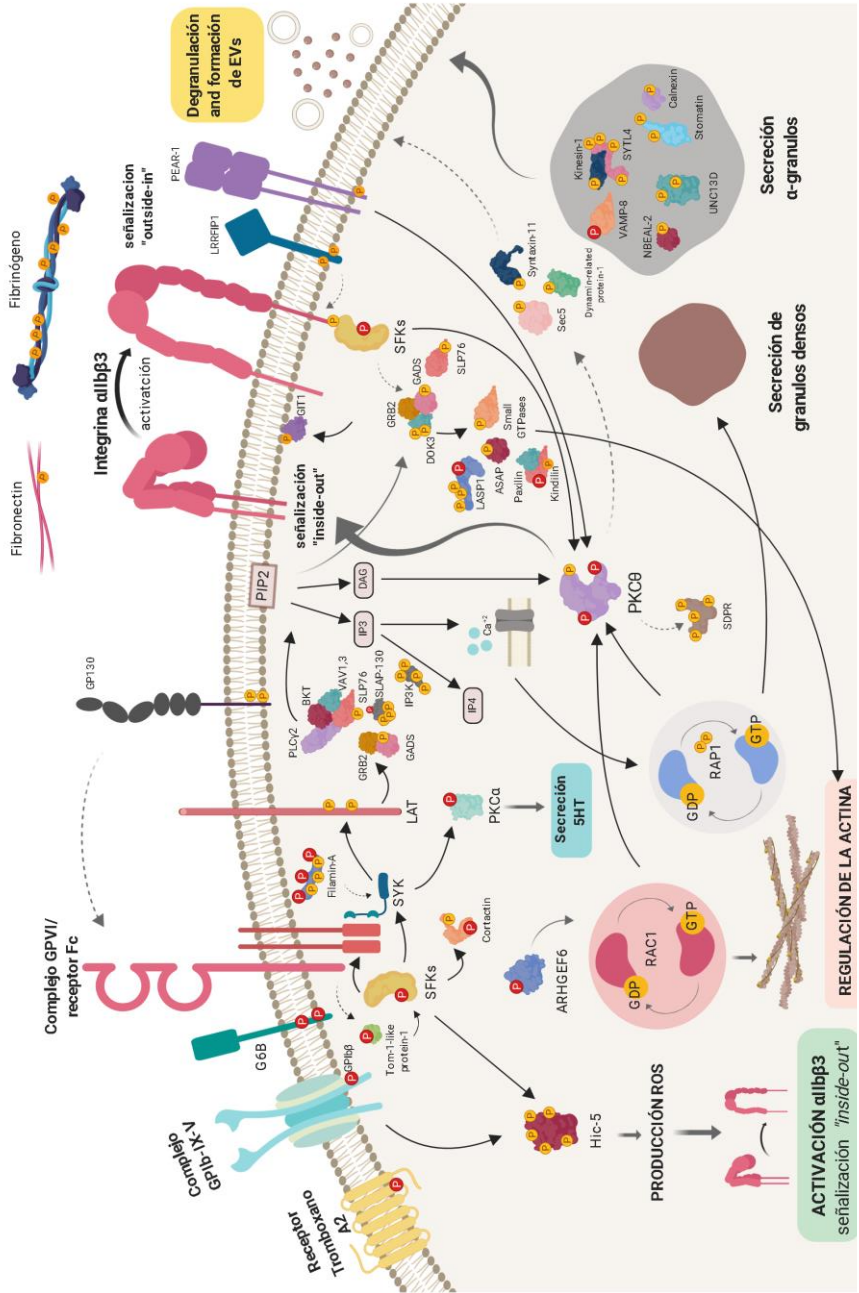


Figura 19: Representación gráfica de los eventos moleculares que ocurren en las plaquetas de los obesos en reposo. Cytoscape-STRING Los residuos pintados en rojo representa que existe una función asociada. Los residuos coloreados en amarillo no tienen una función asociada. Las líneas continuas representan una relación directa proteína-proteína. La línea discontinua representa una relación indirecta.

4.1.2.5.2 Validación de resultados mediante proteómica dirigida

Para corroborar la hiperfosforilación de algunas proteínas claves implicadas en señalización plaquetaria, se procedió a la validación de cuatro de ellas mediante proteómica dirigida. Las proteínas seleccionadas fueron VAMP^{S55}, Src^{Y419}, PCKθ^{S695}, LAT^{S40/S43} dada su estrecha implicación con el transporte de vesículas y las vías de señalización mediadas por SFK, especialmente GPVI y CLEC-2.

Este estudio se realizó con una cohorte independiente de 16 individuos (8 obesos y 8 controles) con el objetivo de validar los resultados de fosfoproteómica. El procedimiento fue el mismo: los fosfopéptidos fueron enriquecidos mediante TiO₂ y posteriormente analizados por MS. Para el análisis de datos se utilizó el software Skyline, donde se determinaron las áreas de los cromatogramas. Una vez realizado el análisis, se determinó la variabilidad interindividual de las muestras mediante el análisis de componentes principales. Puesto que dos muestras (una de cada grupo) presentaban un patrón diferente se decidió eliminarlas del análisis.

Como puede observarse en la **Figura 20**, los datos muestran una clara tendencia de hiperfosforilación de los residuos en el grupo obeso, no obstante, no se encontraron diferencias significativas entre grupos. En el caso de VAMP^{S55} y LAT^{S40/S43} se obtuvo un incremento de *fold change* 2,16 y 1,64 respectivamente en el grupo obeso en línea con los datos obtenidos en el estudio de fosfoproteómica (1,8 y 1,6,

respectivamente). Src^{Y419} y PCKθ^{S695} presentaron un incremento del 1,3 y 1,6 de *fold change* respecto al grupo control.

Estos datos ponen de manifiesto la alta variabilidad que existe entre individuos, aunque apuntan a una hiperfosforilación de dichas proteínas, claves en señalización plaquetaria, en el grupo obeso; en línea con los resultados proteómicos.

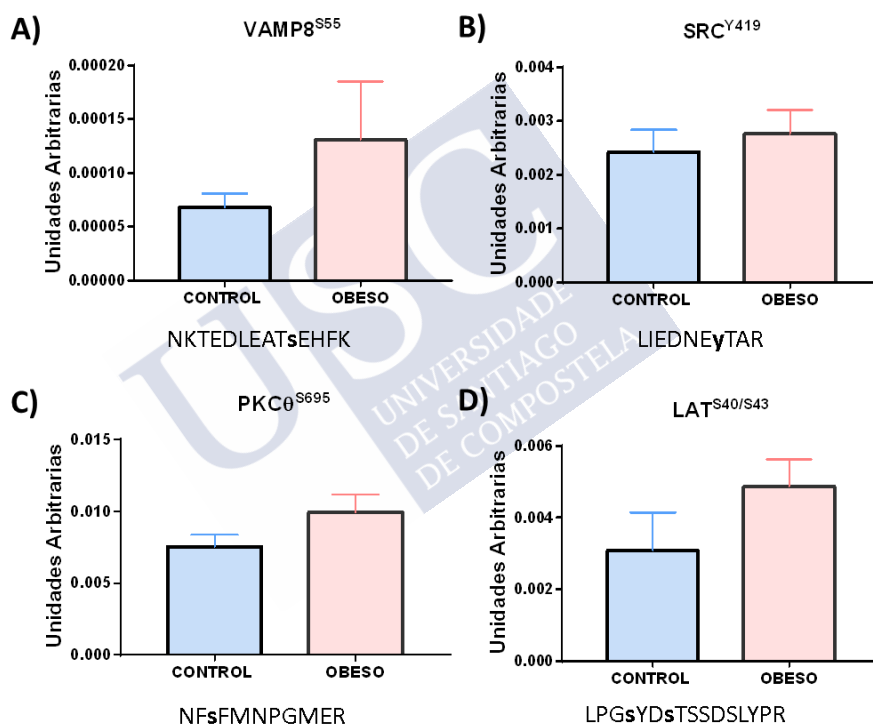


Figura 20: Validación de VAMP^{S55}, Src^{Y419}, PCKθ^{S695}, LAT^{S40/S43} por medio de proteómica dirigida: hiperfosforilación en el grupo obeso. Los fosfopéptidos (A) VAMP^{S55}, (B) Src^{Y419}, (C) PCKθ^{S695}, (D) LAT^{S40/S43} fueron enriquecidos por TiO₂, identificados por MS y analizados mediante Skyline para proteómica dirigida. El área bajo la curva de cada pico fue normalizada por el área total de los picos.

4.1.3 Resultados de los estudios funcionales

4.1.3.1 Estudio de funcional basado en agregaciones mediante activaciones plaquetarias con diferentes agonistas

Para evaluar la hiperreactividad de las plaquetas de los pacientes obesos, se llevaron a cabo en paralelo ensayos funcionales de agregación plaquetaria. Las plaquetas de ambos grupos se estimularon con diferentes agonistas de principales vías de activación plaquetaria: CRP-XL (agonista específico de GPVI), colágeno (agonista de GPVI y de la integrina $\alpha 2\beta 1$), *rhodocytin* (agonista de CLEC-2), trombina (agonista de PAR1/4), ADP (agonista de P2Y1/P2Y12) y AA. Cabe destacar que las agregaciones se realizaron en dos condiciones, una más fisiológica (plasma rico en plaquetas, PRP) y otra en plaquetas aisladas (plaquetas lavadas).

Tras la realización de estos ensayos, se observó que activando las plaquetas con ligandos de GPVI (CRP-XL y colágeno), la agregación de plaquetas de los pacientes obesos era significativamente superior que las plaquetas de los controles delgados. Como se muestra en la **Figura 21**, existen algunas diferencias entre condiciones (PRP o plaquetas lavadas) aunque ambas presentan un aumento de la agregación en el grupo obeso.

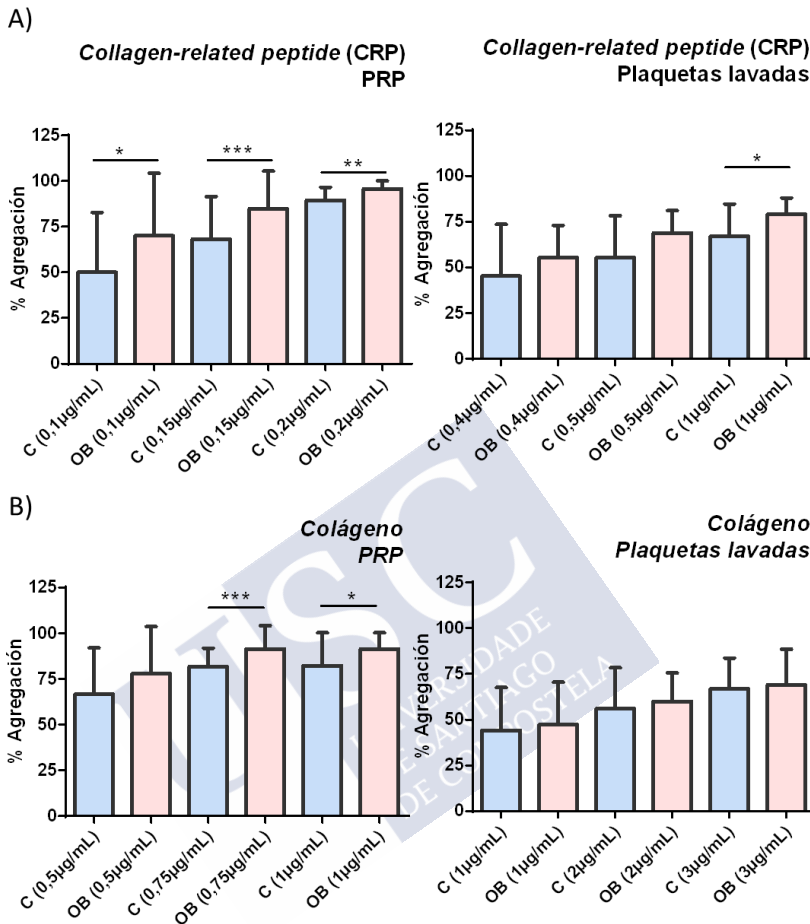


Figura 21: La agregación plaquetaria en respuesta a la activación de GPVI es mayor en las plaquetas de los pacientes obesos comparados con sus controles delgados. Ambas condiciones (PRP y plaquetas lavadas) fueron estimuladas con diferentes agonistas de GPVI. (A) La condición de PRP fue estimulada con CRP-XL (0,1,0,15 o 0,2 µg/mL) o colágeno Horm (0,5,0,75 o 1 µg/mL) durante 5 min para desencadenar la agregación máxima. La condición de plaquetas lavadas fue estimulada con CRP-XL (0,4,0,5 o 1 µg/mL) o colágeno Horm (1,2 o 3 µg/mL). En los resultados se representan la agregación media, el error estándar y el análisis estadístico (Test Mann Whitney) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. OB: paciente obeso, C: control delgado.

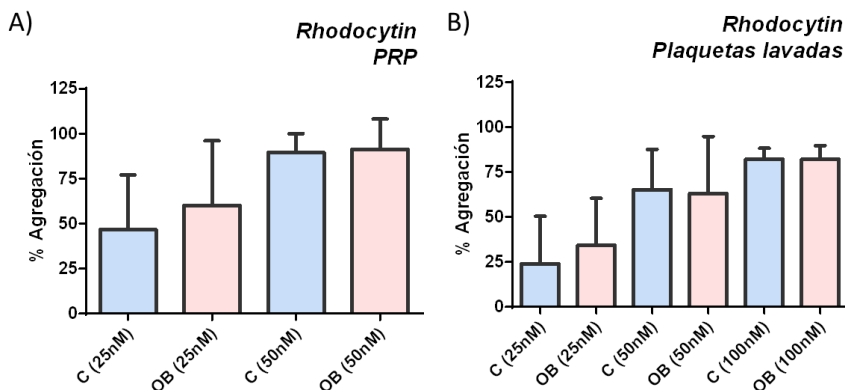


Figura 22: El ensayo de agregación muestra diferencias no significativas después de la estimulación con *Rhodocytin* entre las plaquetas de ambos grupos. Ambas condiciones (PRP y plaquetas lavadas) fueron estimuladas rhodocytin (agonista de CLEC-2) (A) La condición de PRP fue estimulada con rhodocytin (25 y 50 nM), para desencadenar la agregación máxima durante 5 min. (B) La condición de plaquetas lavadas fue estimulada con *rhodocytin* (25, 50 y 100 nM) En los resultados se representa la agregación media y el error estándar. OB: paciente obeso, C: control delgado

No se encontraron diferencias significativas entre grupos cuando se estimularon las plaquetas con el agonista de CLEC-2 rhodocytin (**Figura 22A-B**)

También se realizaron estudios de agregación con diferentes agonistas de vías de señalización no mediadas por la familia de las Src quinasas, como es el caso de ADP, AA y trombina donde no se encontraron diferencias significativas entre grupos (**Figura 23A-C**).

En línea con los resultados obtenidos en la proteómica, los estudios de agregación muestran una hiperreactividad de las plaquetas de los pacientes obesos en respuesta a colágeno y CRP-XL apuntando

a la vía de señalización de GPVI como una de las vías de señalización alteradas en obesidad.

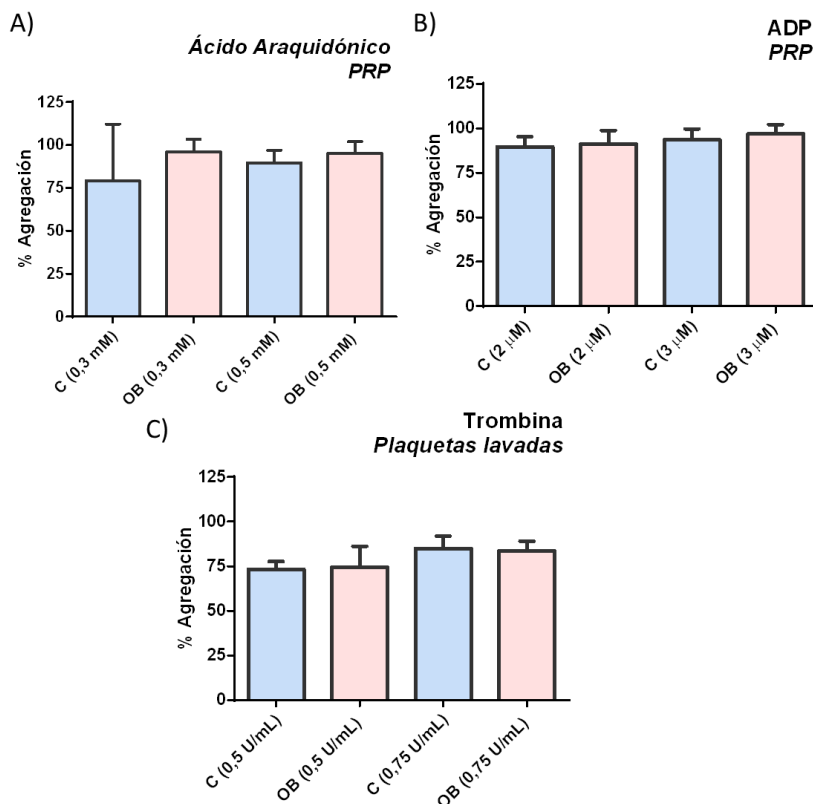


Figura 23: El ensayo de agregación muestra diferencias no significativas después de la estimulación con diferentes agonistas entre las plaquetas de ambos grupos. Ambas condiciones (PRP y plaquetas lavadas) con agonistas de vías de señalización no mediadas por la familia de las Src. (A) La condición de PRP fue estimulada ADP (2 y 3 μM) y AA (0,3 y 0,5 mM) para desencadenar la agregación máxima durante 5 min. La condición de plaquetas lavadas fue estimulada con trombina (0,5 y 0,75 u/mL). En los resultados se representa la agregación media y el error estándar. OB: paciente obeso, C: control delgado

4.1.3.2 Estudio de diferentes receptores en la superficie de la membrana plaquetaria mediante citometría de flujo (CMF): alteración de los receptores ITAM (GPVI y CLEC-2).

Los resultados obtenidos derivados de las diferentes aproximaciones (proteómica, fosfoproteómica, bioquímica y funcional por agregación) muestran una posible alteración en las vías de señalización mediadas por la familia de las Src quinasas, especialmente la vía de señalización del receptor de colágeno GPVI. Por ello, para entender y validar de una manera mecánica los resultados obtenidos, se llevaron a cabo ensayos funcionales basados en CMF midiendo los niveles de expresión de los principales receptores mediados por SFK en la superficie de la membrana de las plaquetas.

En la presente tesis se midieron los niveles de los siguientes receptores en sangre total: GPVI (forma total y dimérica), CLEC-2, integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, y GPIb α (complejo GPIb-IX-V) ya que son específicos de plaquetas. Por otro lado, se midieron los niveles de p-selectina en plaquetas lavadas dada su presencia en otras células sanguíneas tales como leucocitos.

Teniendo en cuenta los datos previos que apuntan hacia una alteración de la vía de señalización de GPVI en obesidad, se midieron los niveles de este receptor en la superficie de las plaquetas en una cohorte amplia de 27 pacientes obesos. Como se muestra en la **Figura 24**, los niveles de expresión de GPVI en la superficie de las plaquetas

se encuentran aumentados en el grupo obeso correlacionando positivamente con el IMC.

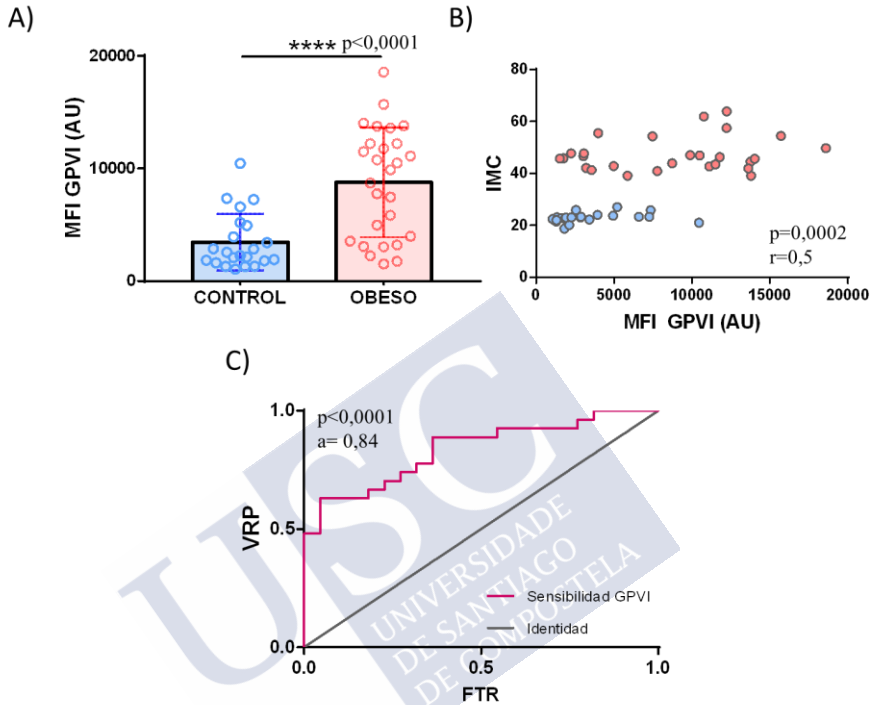


Figura 24: Los niveles de GPVI en la superficie de la plaqueta son más altos en las plaquetas de los pacientes obesos, correlacionando positivamente con el IMC. El estudio se realizó con una cohorte de pacientes (27 obesos frente a 22 controles) pareados por edad y sexo. (A) Se midió la intensidad mediana de fluorescencia (MFI) y las medidas fueron en triplicado. Los gráficos representan la media del MFI, el error estándar y el análisis estadístico. Test estadístico T-test ($****p < 0,0001$) (B) La prueba de Pearson fue utilizada para obtener la correlación entre los niveles de GPVI total y el IMC ($p = 0,0002$, $r = 0,5$). (C) El análisis de curva ROC muestra un área de 0,84 y un $p < 0,0001$). VRP= razón de verdaderos positivos, FTR= razón de falsos positivos, a= área bajo la curva. Los puntos azules representan al grupo control y los rojos al obeso.

Además, el análisis de curva ROC sugiere GPVI como un posible biomarcador ya que tiene un alto grado de sensibilidad a la hora de poder discernir entre ambos grupos (área=0,84) (**Figura 24C**).

Puesto que los resultados de GPVI fueron prometedores, se decidió medir los niveles del receptor en su forma activa, es decir, cuando el receptor se encuentra dimerizado. La forma activa se detectó mediante un anticuerpo específico el cual se une únicamente cuando el receptor se encuentra en forma de dímero. Este anticuerpo fue producido y cedido en colaboración con la Dr. Stephanie M. Jung (Cambridge University, Reino Unido).

En línea con los resultados obtenidos en GPVI total, los niveles de expresión de la forma estaban también aumentados significativamente en las plaquetas de los pacientes obesos (**Figura 25A**). Conjuntamente, los niveles de GPVI dímero de ambos grupos correlacionaban de manera positiva con el IMC y la curva ROC mostraba un grado de sensibilidad significativo (área=0,76) (**Figura 25B-C**).

El receptor de podoplanina, CLEC-2, también es uno de los principales receptores mediados por la familia de las SFK. Aunque los estudios de agregación no mostraban claras diferencias entre grupos (obeso y control), sí que se detectaron proteínas diferenciales relacionadas con la vía de CLEC-2 en los estudios del proteoma y del fosfoproteoma plaquetario. En línea con los resultados, se decidió identificar los niveles de CLEC-2 en la superficie de las plaquetas

mediante un nanoanticuerpo producido y cedido por el Prof. Steve Watson (Birmingham University, Reino Unido).

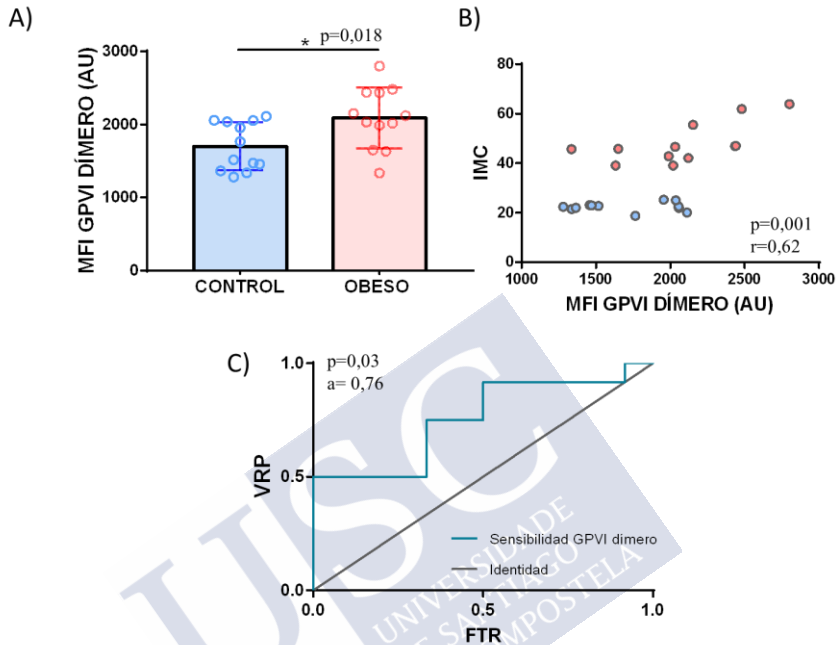


Figura 25: Los niveles de GPVI dímero son más altos en las plaquetas de los pacientes obesos, correlacionando positivamente con el IMC. El estudio se realizó con una cohorte de pacientes obesos y sus controles (n=12). (A) Se midió la MFI y las medidas fueron en triplicado. Los gráficos representan la media del MFI, el error estándar y el análisis estadístico (Test T-test, $*p=0,018$) (B) La correlación fue mediante la prueba Pearson ($p=0,001$, $r=0,62$). (C) El análisis de curva ROC muestra un área de 0,76 y un $p=0,03$. VRP= razón de verdaderos positivos, FTR= razón de falsos positivos, a= área bajo la curva, p= p valor. Los puntos azules representan al grupo control y los rojos al obeso.

De acuerdo con los resultados, los pacientes obesos muestran más niveles de CLEC-2 en la superficie de la membrana de las plaquetas si se comparan con el grupo control correlacionando

positivamente con el IMC (**Figura 26A-B**). Además, las curvas ROC mostraban una alta sensibilidad como biomarcadores para diferenciar la población obesa y delgada (área=0,77) (**Figura 26C**).

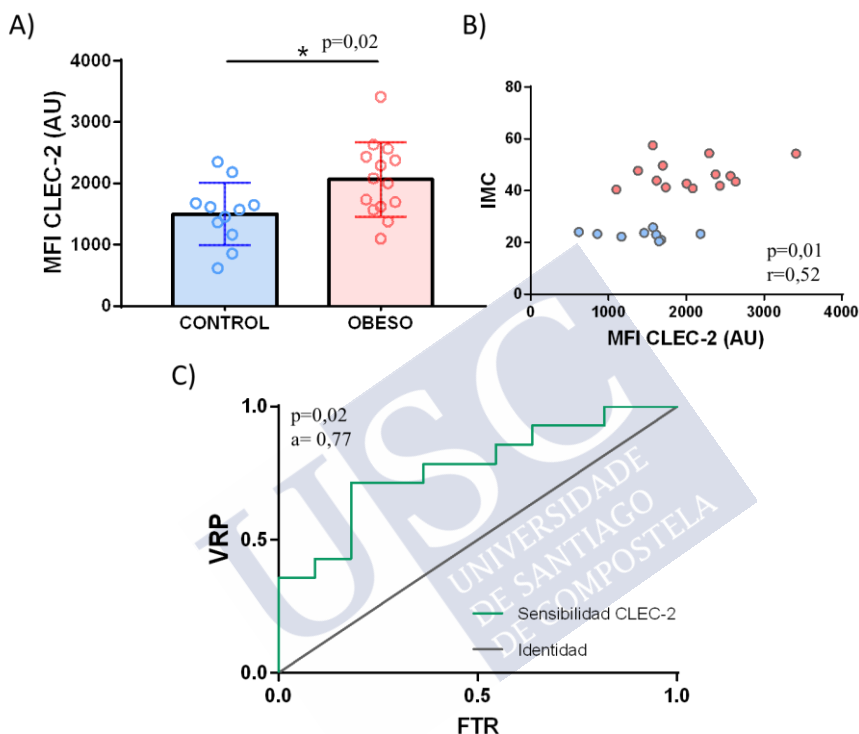


Figura 26: Los niveles de CLEC-2 en la superficie de las plaquetas son más altos en las plaquetas de los pacientes obesos, correlacionando positivamente con el IMC. El estudio se realizó en cohorte de 14 pacientes obesos frente a 11 controles pareados por edad y sexo. (A) Se midió la MFI y las medidas fueron en triplicado. Los gráficos representan la media del MFI, el error estándar y el análisis estadístico. Test estadístico T-test ($*p=0,02$) (B) La prueba de Pearson fue utilizada para obtener la correlación entre los niveles de GPVI total y el IMC ($p=0,01$, $r=0,52$). (C) El análisis de curva ROC muestra un área de 0,77 y un $p<0,02$. VRP= razón de verdaderos positivos, FTR= razón de falsos positivos, a= área bajo la curva, p= p valor. Los puntos azules representan al grupo control y los rojos al obeso.

Tras realizar el análisis de ambos receptores basado en motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM), GPVI y CLEC-2, se examinó si existía alguna correlación entre ambos. Según muestra **Figura 27**, existe una correlación positiva entre los niveles de GPVI y CLEC-2 en la superficie de las plaquetas de ambos grupos. Al mismo tiempo, el análisis de las curvas ROC sugiere una mayor sensibilidad para GPVI ($r=0,84$) que para CLEC-2 ($r=0,77$) apuntando GPVI como mejor biomarcador a la hora de trasladarlo a la clínica.

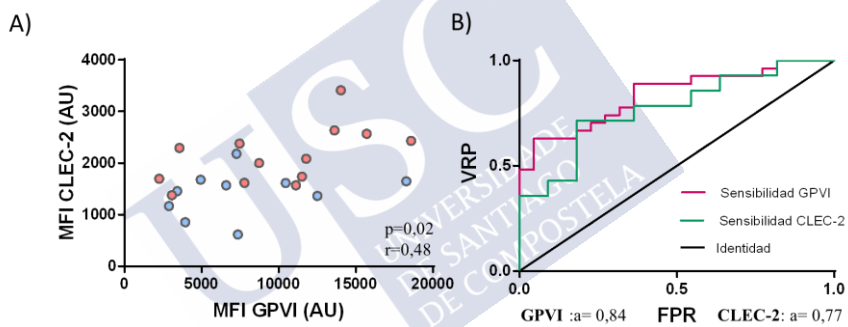


Figura 27: Existe una correlación positiva entre los niveles de GPVI y CLEC-2 en la superficie de las plaquetas. El estudio se realizó con una cohorte de 12 individuos por grupo. (A) La prueba de Pearson fue utilizada para obtener la correlación entre los niveles de GPVI total e CLEC-2 ($p=0,02$, $r=0,48$). (C) El análisis de curva ROC muestra un área de 0,77 y un $p<0,02$). (B) El análisis mediante la Curva ROC para ambos receptores, GPVI (rosa, área 0,84) e CLEC-2 (verde, área 0,77). VRP= razón de verdaderos positivos, FTR= razón de falsos positivos, a= área bajo la curva, p= p valor. Los puntos azules representan al grupo control y los rojos al obeso.

Por otro lado, los resultados de proteómica indicaron una posible alteración de la vía de señalización mediada por la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Por tanto, también se evaluaron los niveles del complejo

(α Ib β 3) en la superficie de la plaqueta. Como muestra la **Figura 28A**, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en los niveles de expresión de α Ib β 3 en la superficie de las plaquetas.

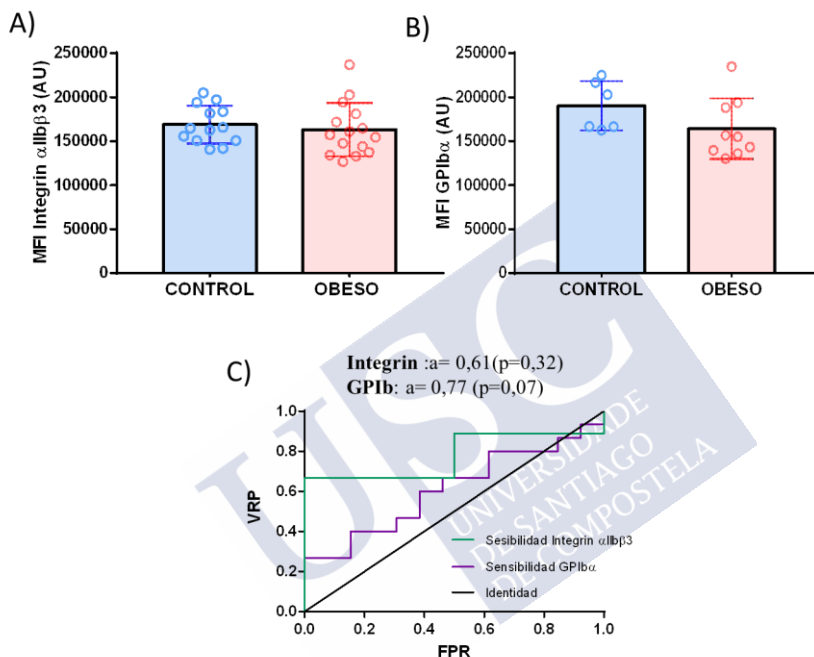


Figura 28: No existen diferencias significativas en los niveles de integrina α Ib β 3 y GPIIb α en la superficie de las plaquetas de los pacientes obesos. Se midió la MFI y las medidas fueron en triplicado. Los gráficos representan la media del MFI y el error estándar (A) El estudio de integrin α Ib β 3 se realizó con una cohorte de 9 pacientes obesos frente a 6 controles pareados por edad y sexo. Test estadístico T-test (p=0,58) (B) El estudio de GPIIb α se realizó con un subgrupo de pacientes (13 obesos frente a 11 controles pareados por edad y sexo). Test estadístico T-test (p=0,15). (C) El análisis mediante la Curva ROC para los receptores, integrin α Ib β 3 (naranja, área 0,61, p=0,32), GPIIb α (morado, área 0,77, p=0,07) VRP= razón de verdaderos positivos, FTR= razón de falsos positivos.

La subunidad GPIb β del complejo GPIb-IX-V, y proteínas comunes que importantes en la vía de señalización medida por los receptores SFK estaban alteradas en el análisis del fosfoproteoma en el grupo obeso. Por esa razón, se midieron también los niveles de GPIba (complejo GPIb-IX-V). En este caso, los resultados muestran que no existían niveles diferenciales entre el grupo obeso y el grupo control (**Figura 28B**). El análisis de curvas ROC de integrin α IIb β 3 y GPIba muestran poca sensibilidad a la hora de diferenciar entre ambos grupos. Como se puede observar en la **Figura 28C**, el área bajo la curva es mucho menor que en GPVI y CLEC-2.

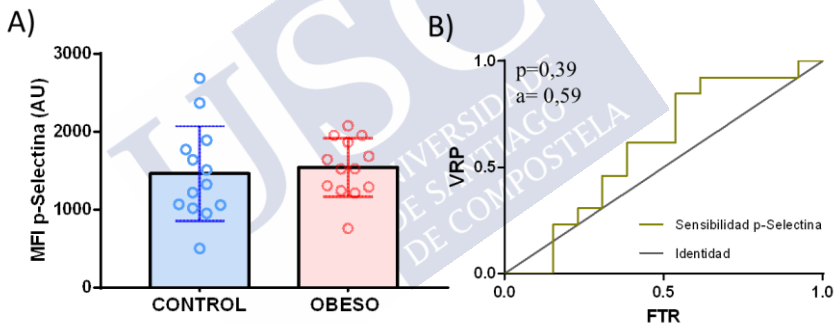


Figura 29: No existen diferencias significativas en los niveles de p-Selectina en la superficie de las plaquetas de los pacientes obesos. Se midió la MFI y las medidas fueron en triplicado. Los gráficos representan la media del MFI y el error estándar (A) El estudio de p-Selectina α se realizó con una cohorte de 13 pacientes obesos frente a 13 controles pareados por edad y sexo). Test estadístico T-test ($p=0,69$). (B) El análisis de la Curva ROC para p-Selectina fue área=0.59, $p=0.39$. VRP= razón de verdaderos positivos, FTR= razón de falsos positivos.

Por último, se analizaron los niveles de p-Selectina, uno de los principales marcadores de activación plaquetaria donde no se encontraron diferencias significativas entre grupos (**Figura 29**).

4.1.3.3 Estudios de adhesión plaquetaria a diferentes ligandos

Para investigar más en profundidad la alteración de la vía de señalización de GPVI y de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, se decidió evaluar la capacidad que tenían las plaquetas de ambos grupos para adherirse a una placa recubierta con sus principales ligandos (colágeno y fibrinógeno).

En el caso de GPVI, las placas fueron recubiertas con colágeno a una dosis de $5\mu\text{g/mL}$. Comparando una cohorte de 10 por cada grupo, se demostró que las plaquetas de los pacientes obesos adhieren más a colágeno que las plaquetas del grupo delgado (**Figura 30A**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en la adhesión a fibrinógeno, aunque existe una tendencia clara de un aumento en los niveles de adhesión en las plaquetas de los pacientes obesos (**Figura 30B**).

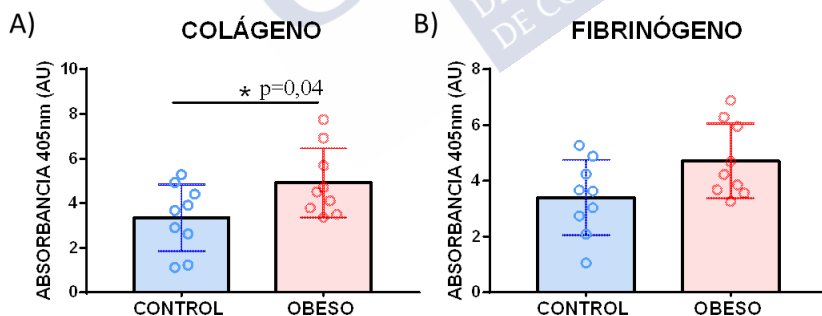


Figura 30: Las plaquetas de los pacientes obesos se adhieren más a colágeno que las plaquetas de los controles delgados. Se utilizó una cohorte de 8 pacientes obesos y sus controles pareados por edad y sexo. Las plaquetas lavadas fueron adheridas a (A) $5\mu\text{g/mL}$ y (B) $100\mu\text{g/mL}$ fibrinógeno. Los datos medición fueron normalizada con el control negativo. La prueba estadística utilizada fue t-test.

Estos resultados están en línea con los descritos anteriormente, donde todo apunta a que existe una hiperactivación plaquetaria, siendo la vía de señalización de GPVI la más alterada.

4.1.4 Estudio de los niveles de GPVI soluble en plasma

Se ha descrito que el receptor de plaquetas específico para colágeno, GPVI, se encuentra estable cuando las plaquetas están en circulación. Sin embargo, bajo condiciones de activación plaquetaria, estrés por rozamiento o activación del factor X, el receptor se escinde y se libera parte de él al plasma (91). El fragmento liberado se trata de un hectodominio de 55kDa que puede ser medido mediante ELISA. Para explorar la posible relación entre la elevación de GPVI y la reactividad plaquetaria, se midieron los niveles de GPVI soluble en el plasma de 22 obesos y 18 controles delgados pareados por edad y sexo.

Como se muestra en la **Figura 31**, existen mayores niveles de GPVI soluble en el plasma del grupo obeso y correlacionado positivamente con el IMC. El análisis de la curva ROC determina una alta sensibilidad de GPVI soluble como biomarcador para diferenciar ambas poblaciones (**Figura 31C**). Esto va en línea con los resultados obtenidos mediante CMF donde se observaba un aumento de GPVI (total y dímero) en la superficie de las plaquetas obesas, apuntando hacia una alteración clara del receptor de colágeno GPVI en obesidad.

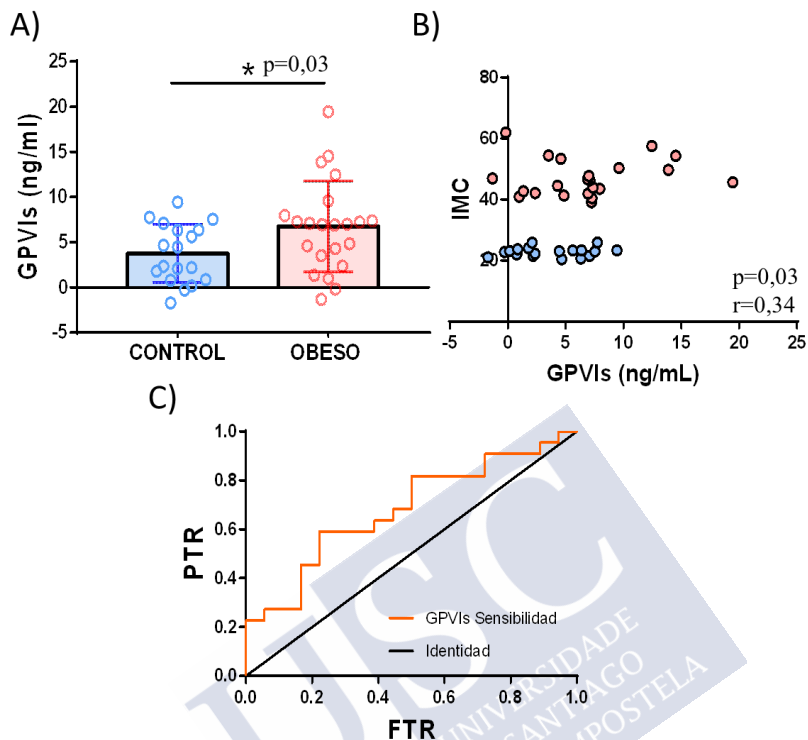


Figura 31: Los niveles de GPVI soluble están aumentados en los pacientes con obesidad. (A) Se midieron los niveles de GPVIs en el plasma de una cohorte de 22 pacientes obesos y 18 controles delgados pareados por edad y sexo mediante ELISA. Test estadístico T - test ($p=0,036$). (B) Se muestra la correlación positiva entre los niveles de GPVIs y IMC en ambos grupos (rojo: obeso; azul: delgado), Test Person, p valor= 0,03, $r=0,34$. (C) Se representa la curva ROC entre obesos y controles.

4.2 ESTUDIO DE LOS LÍPIDOS DE LAS PLAQUETAS EN OBESIDAD

Las plaquetas tienen un papel fundamental en procesos como la hemostasia y trombosis, aunque también participa en inflamación, respuesta inmunitaria, metástasis y angiogénesis. Para poder mantener

todas esas funciones correctamente, los lípidos de la membrana plasmática se tienen que distribuir dentro de un equilibrio y poder mantener así la fluidez de la membrana y la formación de las balsas lipídicas (190).

Durante la activación plaquetaria, los lípidos se remodelan y son entre otros los responsables de los cambios de forma en la plaqueta, la formación de microvesículas y la desgranulación. Además, la activación plaquetaria produce alteraciones en la microviscosidad y la fluidez de la membrana plasmática permitiendo desencadenar la agregación plaquetaria y por consiguiente la formación del trombo (190).

Dado que el individuo obeso presenta alteraciones en el proteoma plaquetario y que existen diferentes vías de señalización alteradas, el objetivo del presente estudio es determinar los niveles de los principales lípidos (lípidos neutros, fosfolípidos, ceramidas y esfingomielina) que se encuentran en la membrana plasmática de las plaquetas y poder encontrar posibles alteraciones de dichos lípidos en obesidad. El análisis se realizó en una cohorte de 9 pacientes con obesidad mórbida y sus controles delgados macheados por edad y sexo. Esta investigación se llevó a cabo en colaboración con el Prof. Bernard Payrastre, investigador principal de la unidad de Lipidómica en el Inserm/UPS UMR 1048, Toulouse (Francia)

4.2.1 Características de los pacientes

El estudio de los lípidos neutros se realizó con un total de 9 pacientes y sus controles delgados pareados por edad y sexo. No obstante, para el estudio de los otros lípidos se utilizó una cohorte de 5 obesos y sus controles delgados. Tal y como se muestra en la **Tabla 18**, se encontraron diferencias significativas en el IMC. Además, cabe destacar que los niveles de colesterol no mostraban diferencias significativas entre grupos.

Tabla 18: Características clínicas de los principales pacientes/participantes en los estudios de validación y estudios funcionales.

Variable	Controles (N =9)	Obesos (N =9)
Edad (años)	43,38 ± 15,56	45 ± 11,40
Mujeres (%)	78%	78%
IMC***	23,21 ± 1,54	45,89 ± 6,10
Diabetes (%)	0%	0%
Análítica		
Hemoglobina (g/dl)	13,86 ± SD 1,45	14,47 ± SD 0,94
Leucocitos/ μ L	5,48 ± SD 1,62	7,13 ± SD 1,72
Plaquetas/ μ L	188100 ± SD 1400	263200 ± SD 4380
Volumen medio plaquetario (fL)	8,92 ± SD 1,08	9,17 ± SD 0,88
Glucosa (mg/dl)	78,57 ± SD 5,06	90,33 ± SD 6,74
Creatinina (mg/dl)	0,73 ± SD 0,14	0,77 ± SD 0,18
Colesterol (mg/dl)	194,3 ± SD 23,49	201,2 ± SD 26,06

^a. Los datos se presentan con la media ± SD o el porcentaje de pacientes. * $p < 0,05$,

*** $p < 0,0001$.

4.2.2 Los niveles de lípidos neutros están alterados en plaquetas de los pacientes obesos

Los lípidos neutros son definidos como aquellas moléculas hidrofóbicas que carecen de grupos cargados. Una vez cuantificadas las

muestras, se identificaron los niveles de colesterol y triglicéridos mediante cromatografía de gases acoplado a MS en una cohorte de 18 individuos (9 obesos mórbidos y sus 9 controles delgados).

Tal y como se muestra en la **Figura 32**, los niveles de colesterol presentes membrana plasmática se encuentran disminuidos en las plaquetas de los pacientes obesos. Asimismo, no se encontraron diferencias en los niveles de triglicéridos en la membrana de las plaquetas de los pacientes obesos. Sin embargo, la tendencia apunta a un aumento de los triglicéridos en el grupo obeso, en línea con los datos clínicos (**Tabla 17**). La alteración de estos lípidos neutros repercuten directamente en la fluidez de la membrana y la microviscosidad de la misma contribuyendo a la activación y agregación plaquetaria (191).

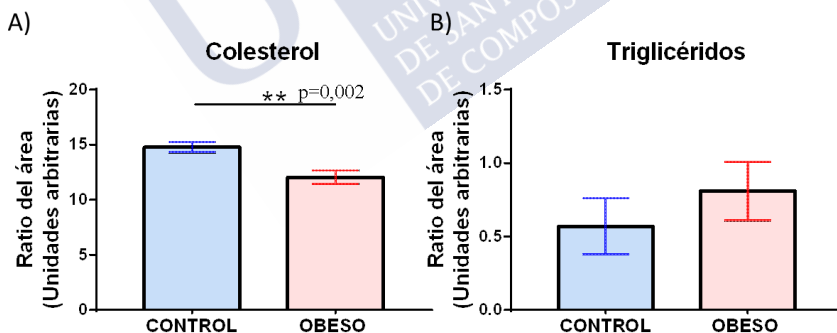


Figura 32: La membrana plasmática plaquetaria de los individuos obesos presenta los niveles de lípidos neutros alterados. Se midieron los niveles de colesterol y triglicéridos de las plaquetas de una cohorte de 9 pacientes obesos y sus controles delgados pareados por edad y sexo mediante cromatografía de gases acoplada a MS. En los resultados se representa el ratio del área (área de la muestra/área del estándar interno), el error estándar y el test estadístico (T-test, $p=0,002$)

4.2.2 Los niveles de fosfolípidos se encuentran disminuidos en obesidad

Una vez analizados los lípidos neutros, se decidió analizar los fosfolípidos principales, las ceramidas y la esfingomieline presentes en la membrana plasmática de la plaqueta de una cohorte de 10 individuos (5 obesos mórbidos y sus controles delgados). Los resultados muestran una disminución significativa de los niveles de ceramidas (Cer) y fosfatidilinositol (PI) en pacientes obesos (**Figura 33**).

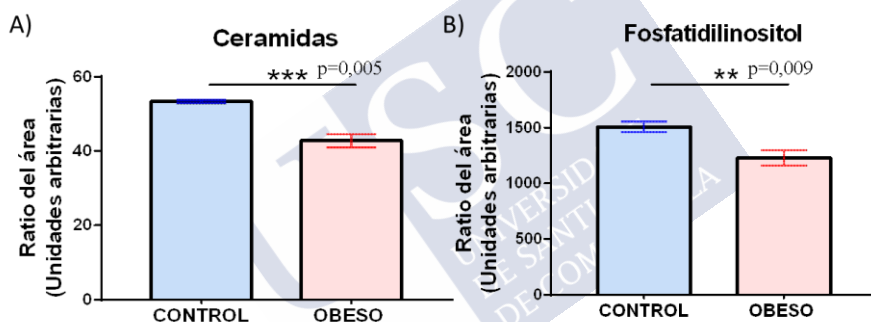


Figura 33: Los niveles de ceramidas y fosfatidilinositol se encuentran disminuidos en la membrana plasmática de las plaquetas obesas. Se midieron los niveles de los siguientes fosfolípidos (A) ceramidas y (B) fosfatidilserina, de las plaquetas de una cohorte de 5 pacientes obesos y sus controles delgados pareados por edad y sexo mediante LC-MS/MS. En los resultados se representa el ratio del área (área de la muestra/área del estándar interno) y el error estándar. El análisis estadístico utilizado fue para muestras pareadas T-test.

Sin embargo, los niveles de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomieline (SM) y fosfatidilserina (PS) no muestran diferencias significativas entre grupos, aunque todo apunta

a una disminución de los niveles de dichos lípidos en el grupo obeso. Estos resultados muestran una alteración del lipidoma plaquetario en los pacientes obesos debido a la hiperactivación plaquetaria presente en obesidad.

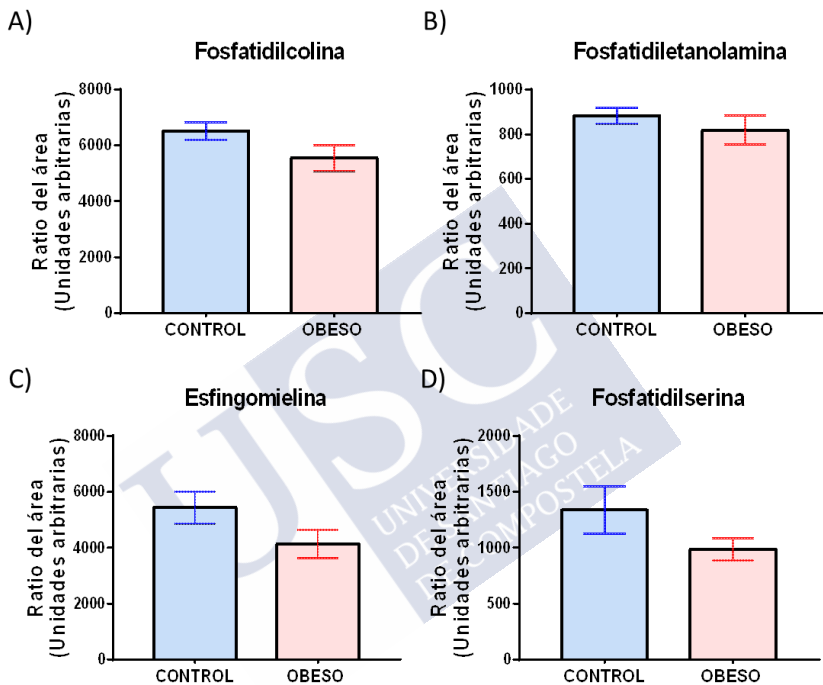


Figura 34: Los niveles de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y fosfatidilserina se encuentran disminuidos en la membrana plasmática de las plaquetas obesas. Se midieron los niveles de los siguientes fosfolípidos: (A) fosfatidilcolina, (B) fosfatidiletanolamina, (C) esfingomielina, (D) fosfatidilserina; de las plaquetas de una cohorte de 5 pacientes obesos y sus controles delgados pareados por edad y sexo mediante LC-MS/MS. En los resultados se representa el ratio (área de la muestra/área del estándar interno) y el error estándar. El análisis estadístico utilizado fue para muestras pareadas T-test.

4.3 ESTUDIO DE LAS PLAQUETAS Y SUS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA

La obesidad está constituida por múltiples factores que contribuyen al desarrollo de la patología por lo que intentar modelar la enfermedad *in vitro* es complicado. Aunque los modelos animales no repliquen con exactitud la patología humana, son una herramienta potente a la hora de comprender el progreso de la enfermedad y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para la prevención y tratamiento de la patología.

Durante las últimas dos décadas, diferentes grupos de investigación del campo de la endocrinología han utilizado el modelo animal DIO para poder entender tanto el desarrollo y persistencia de la obesidad, como las complicaciones metabólicas debidas al exceso de peso (192). Fue en 1958 cuando se publicó uno de los primeros estudios utilizando este modelo animal (193) considerándolo uno de los mejores modelos a la hora de imitar la fisiopatología de la enfermedad en humanos (194).

Actualmente, existen muy pocos estudios que investiguen la disfunción plaquetaria en un modelo de rata obesa (195, 196). Por ello, es fundamental desarrollar un procedimiento estandarizado que permita comparar los resultados obtenidos entre distintos laboratorios y poder transferir los hallazgos a la clínica.

Por tanto, el objetivo del presente estudio es estandarizar un método de extracción de sangre y de aislamiento de plaquetas en un

modelo animal de rata DIO. Para validar la metodología, se llevó a cabo estudios funcionales y bioquímicos. En paralelo, este estudio permitió comparar las plaquetas de las ratas obesas con sus controles pudiendo así correlacionar los datos obtenidos con los resultados previos en pacientes con obesidad mórbida.

4.3.1 Características del modelo animal: el modelo DIO imita las características patológicas de la obesidad

Para desarrollar el modelo animal DIO, las ratas se alimentaron con una dieta alta en grasa (más de 40% contenido graso) 9 semanas, conduciendo al desarrollo de obesidad e hiperglucemia.

El presente estudio se realizó con 40 ratas macho, especie *Sprague-Dawley*. Durante la primera semana del procedimiento (semana de aclimatación), se les permitió libre acceso a la comida (10% grasa) y agua. Una vez pasada esa fase, las ratas fueron separadas de manera aleatoria en dos grupos experimentales (n=20 animales/grupo): grupo control, que fueron alimentados con una dieta estándar y grupo DIO, que fueron alimentados con una dieta alta en grasa (60% grasa), ambos grupos fueron alimentados *at libitum* (**Figura 35A**).

Como se muestra en la **Figura 35B**, el peso fue aumentando durante todo el proceso en el grupo de ratas que fueron alimentadas con dieta alta en grasa. Después de 9 semanas, el grupo DIO presentaba diferencias significativas en la distribución del peso corporal comparado con el grupo control (**Figura 35C**).

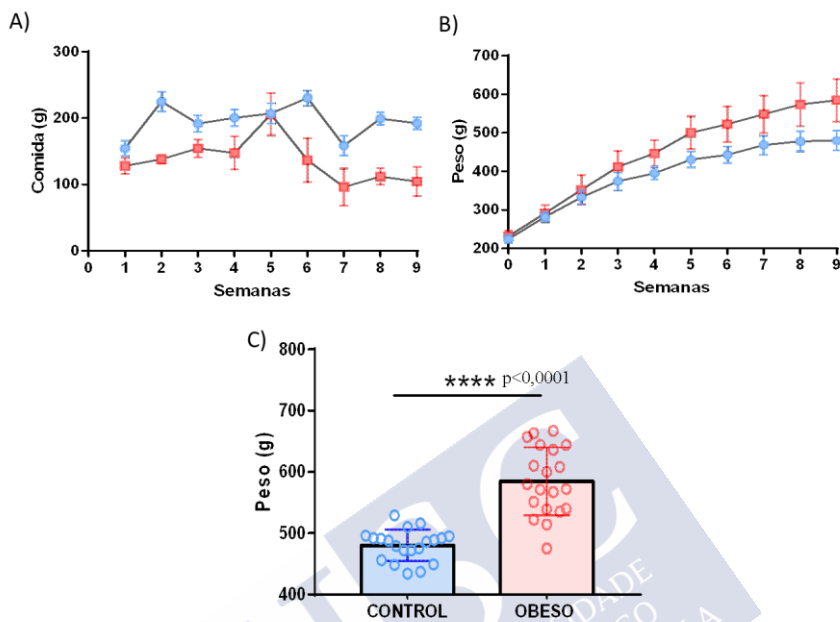


Figura 35: Análisis de los parámetros del modelo de rata DIO. Se midió (A) la cantidad de ingesta de alimento (g) y (B) ganancia de peso (g) durante todo el proceso. (C) También se muestra el peso (g) de ambos grupos al final del procedimiento. (D) En los resultados se representa la media y el error estándar. El análisis estadístico utilizado fue para muestras pareadas T-test ($p < 0,0001$).

La semana previa a la eutanasia (semana 8), se analizaron los niveles de glucosa en ayunas donde se mostró que el grupo DIO presentaba niveles más altos que el control correlacionándose además manera positiva con el IMC (**Figura 36**).

Además, se midieron otros parámetros antropométricos tales como la circunferencia abdominal y torácica, dada su relevancia en obesidad. Según muestra la **Tabla 19**, los resultados apuntan a que la

dieta alta en grasa causa un aumento en el tamaño de la circunferencia abdominal y torácica.

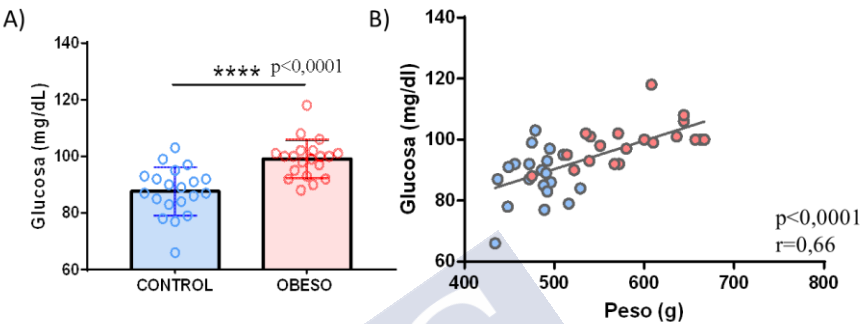


Figura 36: Análisis de los niveles de glucosa en el modelo de rata DIO. Se midieron (A) los niveles de glucosa en ayunas y (B) la correlación entre los niveles de glucosa y el peso. En los resultados se representa la media y el error estándar. El análisis estadístico utilizado fue para muestras pareadas T-test. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Table 19. Características del modelo animal: ratas *Sprague-Dawley* después de ser alimentadas con dieta estándar o alta en grasa durante 9 semanas.

PARÁMETROS	CONTROL	GRUPO DIO
Peso (kg)*	480.3 ± SD 25.49	584.8 ± SD55.51
Glucosa (mg/dL)*	87.65± SD 8.54	99.1 ± SD 6.80
Circunferencia abdominal (cm)*	18.67 ± SD 1.45	21.78 ± SD 1.66
Circunferencia torácica (cm)*	17.53 ± SD 1.17	19 ± SD 0.84

* $p < 0.05$

4.3.2 Establecimiento de un método reproducible de aislamiento de plaquetas en un modelo de rata DIO

En la literatura existe una gran variedad de protocolos que permiten el estudio de la función plaquetaria. Sin embargo, dependiendo del experimento planeado es importante tener en cuenta la mejor opción a la hora de la extracción de sangre y el aislamiento de las plaquetas. En el presente estudio se consultaron diferentes guías de procedimientos en ratón. En base a esas guías, los protocolos fueron modificados y adaptados para nuestro modelo animal de rata (186, 197).

Una vez acabadas las 9 semanas del procedimiento, las ratas fueron eutanasiadas intraperitonealmente con un cóctel de ketamina/xilacina para su posterior extracción de sangre. Basándose en los protocolos de ratón, la sangre se extrajo de la vena cava ya que es la mejor opción a la hora de obtener más cantidad de sangre. El anticoagulante utilizado fue el citrato sódico en línea con las recomendaciones para estudios de investigación con plaquetas (197).

Durante años, los métodos de aislamiento de plaquetas en humano han sido adaptados a los modelos animales. El procedimiento de aislamiento de plaquetas se basó en un protocolo de centrifugaciones seriadas evitando la contaminación de otras células sanguíneas así como la activación plaquetaria espontánea (198). Para impedir que la muestra se contaminara con eritrocitos, los tubos de sangre se mantuvieron en reposo durante 5 min después de la primera centrifugación.

Como se muestra en la **Figura 37A**, los niveles de PRP fueron similares entre grupos apuntando hacia un alto grado de reproducibilidad en el procedimiento.

Las ratas DIO presentaban los niveles de PLT más altos que en el grupo control, confirmando los estudios previos observados en humanos (**Figura 37B**). Además, estudios determinan que el contejo plaquetario (PLT) es un posible biomarcador de riesgo cardiovascular (199).

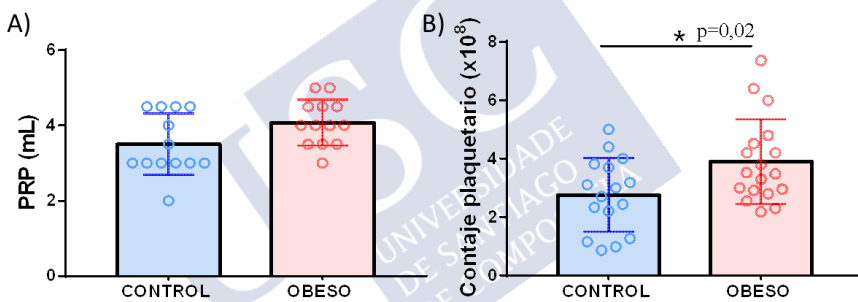


Figura 37: Análisis de los parámetros de extracción y aislamiento de plaquetas. Se muestra los niveles de (A) PRP y (B) el contejo plaquetario obtenidos en el estudio. El análisis estadístico utilizado fue para muestras pareadas T-test ($p=0.02$)

Uno de los principales problemas a considerar cuando se establece un protocolo de aislamiento de plaquetas es la contaminación con otros tipos celulares. Se midieron mediante citometría de flujo (CMF) los niveles de contaminación basándose en la complejidad y el tamaño de las células. Los resultados demostraron que más del 99% de la muestra eran plaquetas “puras” (**Figura 38A-B**). Otro indicador del

tamaño de las plaquetas es el parámetro *forward scatter* (FSC) obtenido por CMF. Se observó que el tamaño plaquetario entre ambos grupos era similar (**Figura 38C**).

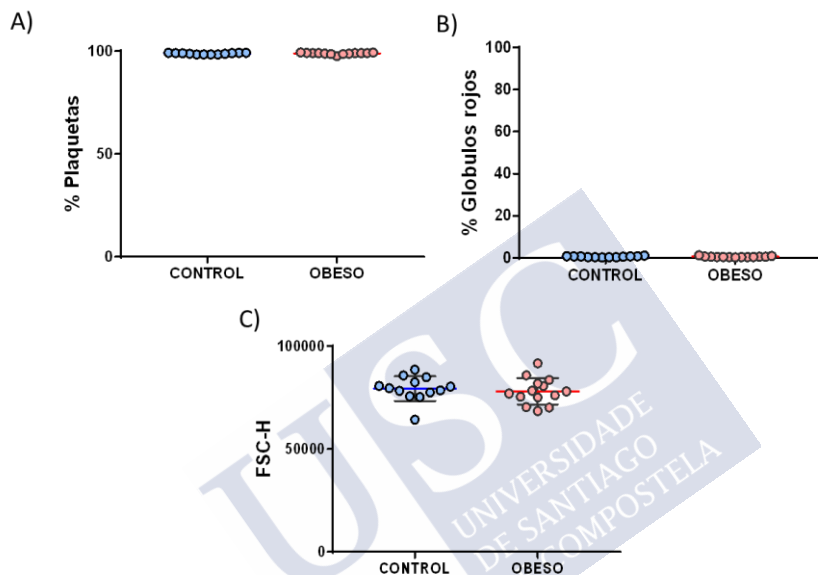


Figura 38: Análisis de la eficiencia en la extracción y purificación de las plaquetas. Se muestra (A) el % plaquetas, (B) % glóbulos rojos y (C) el tamaño plaquetario. Los resultados se midieron mediante citometría de flujo y en duplicado. En los gráficos se representa la media y el error estándar. El análisis estadístico utilizado fue para muestras pareadas T-test.

Los resultados ponen en manifiesto que la metodología empleada tiene un alto grado de reproducibilidad entre grupos permitiendo que más del 99% de la muestra sean plaquetas puras.

4.3.3 El perfil proteico de las plaquetas de rata muestra similitudes cuando lo comparas con el perfil humano.

Para evaluar la contaminación de proteínas plasmáticas en las muestras, se analizó el proteoma de las plaquetas de la rata mediante la técnica 2D y así poder compararlo con el perfil de las plaquetas humanas. El análisis se realizó en el rango de pI 4-7, dando que la mayoría de proteínas relevantes se encuentra distribuido en dicho rango (166). Tal y como se muestra en la **Figura 39**, el perfil proteico obtenido de las plaquetas de rata muestra similitudes con el perfil humano. De hecho, estos resultados validan de alguna manera tanto el método de aislamiento y su uso en estudios proteómicos.

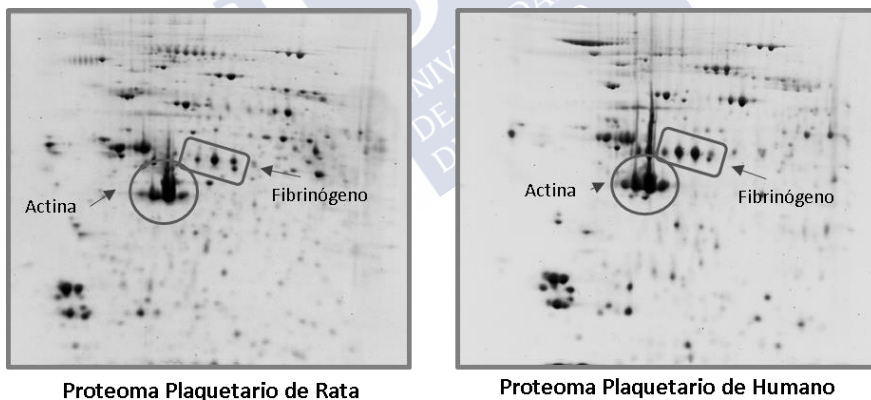


Figura 39: El perfil proteico de las plaquetas de rata muestra similitudes con el perfil humano. Muestra representativa del proteoma plaquetario en 2D de rata (izquierda) y de humano (derecha). Se utilizaron tiras de 7 cm y geles SDS-PAGE al 11%. Las proteínas importantes como actina y fibrinógeno están señaladas con una flecha.

4.3.4 Los niveles de la forma activa de Src (pTyr⁴¹⁹) están aumentados en el grupo DIO

Para poder caracterizar nuestro modelo de una manera bioquímica y también correlacionar con los datos previos en humano, se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección. Se analizó Src^{Y419}, fosfoproteína clave que hemos visto previamente alterada en obesos por medio de diferentes métodos (inmunodetección y fosfoproteómica).

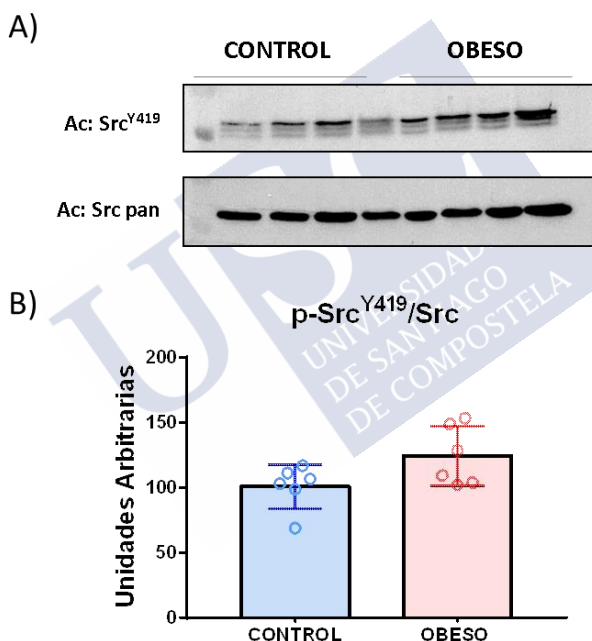


Figura 40: Inmunodetección de la forma activa de Src: Src^{Y419} se encuentra sobreexpresada en el grupo DIO. A) Imagen representativa, obtenida mediante inmunodetección, de los niveles de expresión de Src^{Y419} y src total B) Se muestran histogramas representando la intensidad media de las bandas, el error estándar y el análisis estadístico corregido con Src total. Test estadístico (p=0.076). Ac: anticuerpo.

Para este estudio, los animales fueron clasificados en función a los niveles de glucosa y de peso. Sólo aquellas ratas con pesos extremos y niveles altos de glucosa fueron utilizadas en el estudio (comparando 6 rata por grupo) intentando simular la comparación entre obesos mórbidos y controles delgados.

Usando un anticuerpo específico, se observó que existe una clara tendencia donde las plaquetas del grupo DIO tienen los niveles Src^{Y419} elevados si se comparan con los controles (**Figura 40**).

4.3.5 La adhesión plaquetaria al colágeno es mayor en el grupo DIO

Con el fin de validar la metodología y correlacionar los resultados obtenidos en humano, se llevaron a cabo ensayos de adhesión estática a colágeno y a fibrinógeno. Para el análisis, se utilizó una cohorte de 12 ratas DIO y sus 12 controles delgados.

Las plaquetas del grupo DIO adhieren más a colágeno, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la adhesión a fibrinógeno (**Figura 41**). Estos resultados confirman la viabilidad de las plaquetas para análisis funcionales. Además, refuerzan los datos obtenidos previamente en el estudio con humanos donde se muestra también que las plaquetas de los pacientes obesos adhieren más a colágeno. Por tanto, los estudios funcionales de adhesión en rata también confirman que existe una alteración de la vía de señalización de GPVI en obesidad.

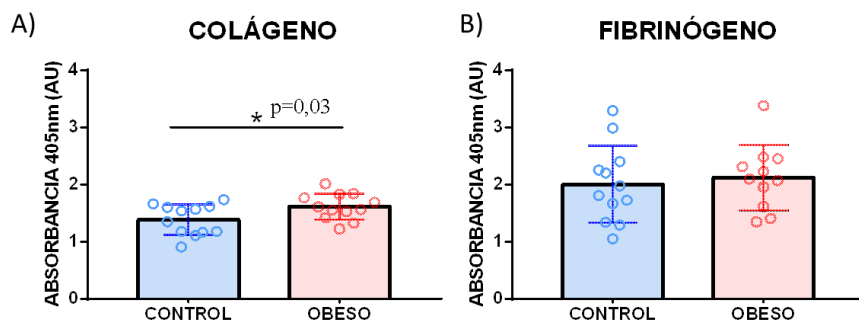


Figura 41: Las plaquetas del grupo DIO presentan más adhesión frente a colágeno. Se adhirieron plaquetas lavadas de ambos grupos a placas recubiertas de (A) colágeno (5µg/mL) y (B) fibrinógeno (10µg/mL). Se midieron los niveles de adhesión por absorbancia a 405 nm y los datos fueron normalizados con el control negativo (condición sin ligando). En los resultados se representa la media y el error estándar. El análisis estadístico utilizado fue para muestras pareadas T-test. *p<0,05

4.4 ESTUDIO DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs) COMO FUENTE DE BIOMARCADORES

Las VEs son un grupo de vesículas compuestas por una bicapa lipídica que contiene un gran repertorio de moléculas como proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos. Durante los últimos años, el interés de estas vesículas ha crecido de forma exponencial ya que están relacionadas directamente con la comunicación célula-célula, activación celular, inflamación y haemostasis. De hecho, el papel que tienen estas vesículas como dianas terapéuticas prometedoras y fuentes de biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de diferentes patologías ha ganado bastante interés en la comunidad científica. Por eso mismo, el objetivo principal de esta parte de la tesis se centra en la búsqueda de biomarcadores procedentes de las VEs con el objetivo de predecir el desarrollo de eventos patológicos asociados con la obesidad.

4.4.1 Característica de los pacientes

Para el estudio VEs presentes en el plasma, se admitieron un total de 27 pacientes obesidad mórbida en el *Servizo de Endocrinoloxía* de la *Xerencia de Xestión Integrada* de Santiago de Compostela y un grupo control formado por 27 individuos delgados pareados por edad y sexo. Este estudio consta de tres aproximaciones distintas (2D-DIGE, *label free* LC-MS/MS y validaciones) que divide los pacientes en tres grupos: una cohorte de 10 pacientes obesos y sus controles delgados pareados

por edad y sexo (2D-DIGE), 12 pacientes (*label free* LC-MS/MS) y por último las validaciones (inmunodetección, $n=5/\text{grupo}$). Según los datos recogidos en la **Tabla 20**, se encontraron diferencias significativas en el IMC ($p<0,0001$).

Tabla 20: Características clínicas de los pacientes/participantes recogidos en ambas aproximaciones proteómicas (técnicas 2D-DIGE y *label free* LC-MS/MS).

Variable	Controles (N =22)	Obesos (N =22)
Edad (años)	35,45 ± 11,28	35,41 ± 11,42
Mujeres (%)	86%	86%
IMC***	22,04 ± 1,82	45,50 ± 5,40
Diabetes (%)	0%	4.5%
Análítica		
Hemoglobina (g/dl)	13,67 ± SD 1,24	13,97 ± SD 0,94
Leucocitos/ μL *	7,01 ± SD 4,77	8,77 ± SD 2,57
Plaquetas/ μL	2413600 ± SD 54110	269500 ± SD 68680
Volumen medio plaquetario (fL)*	9,66 ± SD 1,51	8,43 ± SD 1,19
Glucosa (mg/dl)	85,19 ± SD 9,23	86,05 ± SD 12,92
Creatinina (mg/dl)	0,74 ± SD 0,13	0,68 ± SD 0,14
Colesterol (mg/dl)	194,68 ± SD 34,80	180,41 ± SD 29,95

^a. Los datos se presentan con la media ± SD o el porcentaje de pacientes. * $p<0,05$,

*** $p<0,0001$.

4.4.2 Caracterización de las VEs

Las VEs circulantes fueron aisladas a partir de muestras de sangre mediante un protocolo estandarizado de centrifugaciones y ultracentrifugaciones seriadas por el cual no se permite distinguir entre microvesículas (MVs) y exosomas. Por esto, la ISEV recomienda

utilizar al menos dos técnicas diferentes de caracterización a la hora de caracterizar las muestras de VEs (112).

Con el fin de caracterizar las muestras del presente estudio, se realizaron un total cuatro técnicas: microscopia de transmisión electrónica (TEM), enumeración de partículas (NTA), citometría de flujo (CMF) e inmunodetección, que permitieron confirmar la presencia de MVs y exosomas en la muestra.

Como se muestra en la **Figura 42A**, se detectaron dos poblaciones con diferente tamaño en la muestra mediante TEM, una referida a MVs (100-1.000 nm) y otra a exosomas (30-100 nm). Además, la técnica de NTA permitió identificar que la gran mayoría de las vesículas se encontraban distribuidas entre 100-300 nm de tamaño. Estos resultados apuntaban a una mayor presencia de MVs en el plasma. Sin embargo, también encontramos una población de vesículas con menor tamaño (100nm), las cuales podrían referirse a la presencia de exosomas en la muestra (**Figura 42B**). Cabe resaltar que se encontraron mayores niveles de VEs en las muestras de los pacientes obesos después del aislamiento, aunque la distribución entre poblaciones era similar en ambos casos. Además, se confirmó la existencia de la población de MVs mediante CMF usando un protocolo establecido de doble marcaje (**Figura 42C**). Conjuntamente, también se validaron marcadores de VEs como es el caso de CD9 y flotilin-1 para exosomas y la integrina α IIb (CD41) para MVs mediante inmunodetección donde no se encontraron diferencias significativas entre grupos (**Figura 42D**).

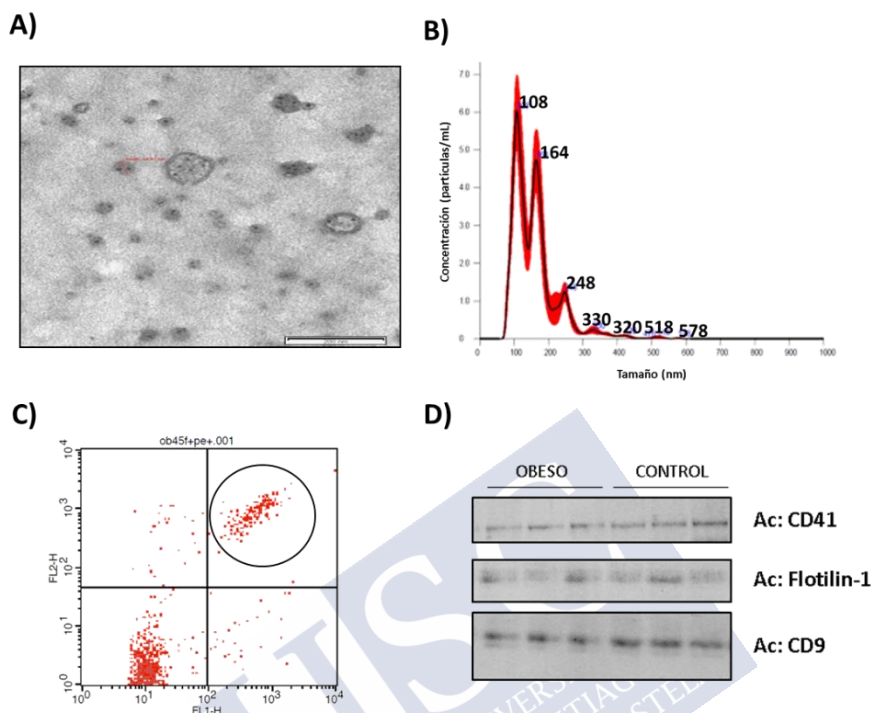


Figura 42: Caracterización de las diferentes poblaciones de vesículas extracelulares circulantes en las muestras clínicas: microvesículas y exosomas. (A) Caracterización mediante microscopia de transmisión electrónica: MVs (tamaño > 100 nm) y exosomas (30-100 nm). (B) Estimación del porcentaje, en concentración, de cada subpoblación de VEs por de rastreo de nanopartículas enumeración de nanopartículas. El pico más alto se encuentra alrededor de 100 nm. Las líneas negras representan la media de la concentración de los 5 replicados. La línea roja representa la desviación estándar. En todos los casos, las muestras analizadas corresponden a grupos de 4 individuos. (C) Gráfico representativo del análisis basado en citometría de flujo. Las MVs de la muestra se identifican en el cuadrante señalado (partículas doble positivas tanto a Anexina V como a CD41). (D) Análisis mediante inmunodetección de los niveles de expresión de CD41, Flotilin-1 y CD9 en muestras individuales de VEs (n=6).

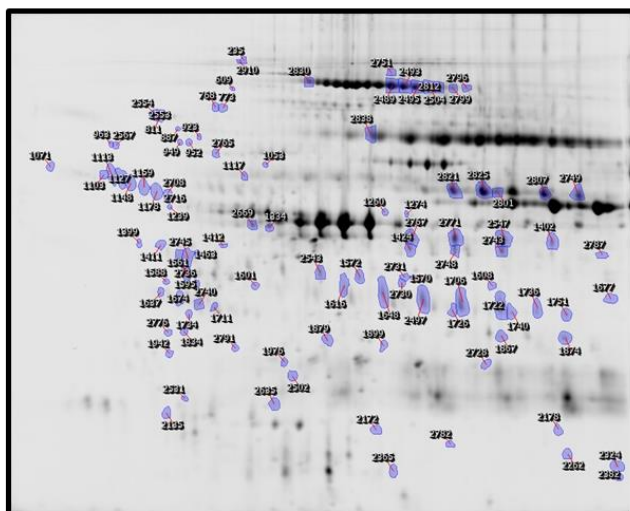
4.4.3 Análisis del proteoma de las VEs circulantes presentes en el plasma de pacientes obesos mediante la técnica 2D-DIGE

La primera aproximación que se abordó fue un análisis proteómico basado en la técnica 2D-DIGE. Para el estudio se utilizaron *pools* de 10 individuos por grupo (6 réplicas técnicas), dado que la cantidad de proteína obtenida de las VEs es limitante.

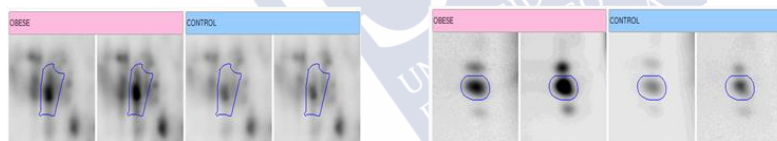
El análisis diferencial identificó un total de 170 manchas proteicas que se encontraban reguladas de manera diferencial entre los grupos (corte de *fold-change* $\geq 1,4$; p valor $< 0,05$; **Figura 43**) de las cuales 57 estaban aumentadas en el grupo obesos, mientras que 50 estaban disminuidas. Finalmente, se identificaron un total de 34 manchas en el gel que correspondían a 22 proteínas únicas (**Tabla 21**)

Debido al gran número de diferencias detectadas (más de 100), se decidió cortar del gel una mancha representativa de cada grupo de proteínas (conjuntos de manchas presentes en un mismo *array* en el gel). Entre estas proteínas se encontraron α -2-macroglobulina, β -fibrinógeno, complemento C1s y kininogeno-1. Además, es importante destacar que todas las proteínas identificadas, excepto la inmunoglobulina cadena kapa V-I, estaban descritas en las bases de datos de VEs disponibles (178, 180).

A)



B)



COMPLEMENTO C3

FIBRINÓGENO CADENA α

Figura 43: Análisis proteómico diferencial mediante la técnica 2D-DIGE de VEs procedentes de pacientes obesos y sus controles delgados. (A) Imagen representativa en escala de grises. La figura muestra la localización de las manchas que se encuentran alteradas cuando se comparan ambos grupos. La identificación de las proteínas se muestra en la tabla XX. (B) Imagen aumentada representativa a las manchas de fibrinógeno y complemento C3 que se encuentran aumentados en el grupo obeso.

Tabla 21: Estudio del proteoma de las VEs: lista de fosfoproteínas identificadas de manera diferencial mediante la técnica 2D-DIGE.

ORF	Nombre	Proceso Biológico	Vesiclepedia (178)	Mancha	Ratio
A2MG_HUMAN	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	Coagulación	Si	1171 2830 2799 2489 2812 2749 1561 2745 2736 2531	-1.4 -1.5 -1.6 -2.3 -1.5 -1.7 +1.5 +1.5 +1.4 +2.1
APOL1_HUMAN	<i>Apolipoprotein L1</i>	Proceso metabólico del colesterol	Si	1874	-1.5
C1S_HUMAN	<i>Complement C1s subcomponent</i>	Activación del complemento	Si	811 2554	+1.5 +1.6
CAMP3_HUMAN	<i>Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3</i>	Organización del citoesqueleto	Si	1879	+1.4
CLUS_HUMAN	<i>Clusterin</i>	Metabolismo de lípidos	Si	1674 2740	-1.5 -1.4
CO3_HUMAN	<i>Complement C3</i>	Metabolismo de ácidos grasos	Si	1561 2745	+1.5 +1.5
CO4B_HUMAN	<i>Complement C4-B</i>	Respuesta inflamatoria	Si	2502	+2
FCGBP_HUMAN	<i>IgG Fc-binding protein</i>	Respuesta inflamatoria	Si	1178 2708	+1.6 +1.5
FIBA_HUMAN	<i>Fibrinogen alpha chain</i>	Agregación plaquetaria	Si	1677 2324 2787 2262	+1.6 +2.2 +1.7 +2.2
FIBB_HUMAN	<i>Fibrinogen beta chain</i>	Agregación plaquetaria	Si	2749	-1.7
FIBG_HUMAN	<i>Fibrinogen gamma chain</i>	Agregación plaquetaria	Si	1334 2669 2728 1879	-1.8 -1.4 +2 +1.4
FINC_HUMAN	<i>Fibronectin</i>	Degranulación plaquetaria	Si	235	+1.4
HPT_HUMAN	<i>Haptoglobin</i>	Respuesta en fase aguda	Si	2543 1648	+1.6 +1.8
HPTR_HUMAN	<i>Haptoglobin-related protein</i>	Inmunidad inata	Si	1722 1648	-1.7 +1.8

HRG_HUMAN	<i>Histidine-rich glycoprotein</i>	Fibrinólisis	Si	1601	+1.7
IGHM_HUMAN	<i>Immunoglobulin mu chain C region</i>	Activación del complemento	Si	2838	-1.6
IGKC_HUMAN	<i>Immunoglobulin kappa chain C region</i>	Activación del complemento	Si	2635	+1.4
IGLC3_HUMAN	<i>Immunoglobulin lambda constant 3</i>	Respuesta inmune	Si	2502	+2
KNG1_HUMAN	<i>Kininogen-1</i>	Degranulación plaquetaria	Si	2708 1178 1113	+1.5 +1.6 +1.5
KV101_HUMAN	<i>Immunoglobulin kappa chain V-I</i>	Activación del complemento	No	2635	+1.4
MUCB_HUMAN	<i>Immunoglobulin mu heavy chain disease protein</i>	Activación del complemento	Si	2838	-1.6
PZP_HUMAN	<i>Pregnancy zone protein</i>	Embarazo	Si	2830	-1.5

a. Ratio: El ratio se representa grupo obeso frente a grupo control.

En cuanto a la función proteica de las proteínas diferenciales, 8 de ellas forman parte de la cascada de la coagulación y del complemento (ej. Complemento C3, complemento C4b, α -2-macroglobulina, kininogeno-1 y fibrinógeno). Cabe resaltar que se realizó un estudio biología de sistemas mediante el software STRING mostrando que el 70% de las proteínas aumentadas en las vesículas del grupo obeso estaban relacionadas con la respuesta ante el estrés como complemento C1s, α -2-macroglobulina, haptoglobina, kininogeno-1 y fibrinógeno.

Estos resultados apuntan a una alteración de proteínas relacionadas con la cascada complemento y de la coagulación que puede ser debida al estado protrombótico y proinflamatorio que presenta el individuo obeso.

4.4.4 Análisis del perfil proteómico de las VEs mediante la técnica *Label Free* LC-MS/MS

Con el fin de realizar un análisis más exhaustivo, se decidió expandir el estudio utilizando otra aproximación proteómica complementaria (*Label Free* LC-MS/MS). Para ello, se analizaron las VEs derivadas del plasma de una cohorte independiente de pacientes, 12 obesos (4 pools de 3 individuos) y sus controles delgados pareados por edad y sexo.

En cuanto a los resultados, se identificaron un total de 227 proteínas mediante *Label Free* LC-MS/MS, al menos 129 con dos péptidos identificados.

Con vistas a obtener un mayor conocimiento del proteoma de las VEs, se realizó el análisis de todas las proteínas identificadas (227) mediante el software Funrich. De ellas, más del 50% de las proteínas están descritas en exosomas. En cuanto a los procesos biológicos, la gran mayoría de proteínas identificadas se clasificaron como de respuesta inmune (16,3%) y transporte (11,6%). Asimismo, el software Funrich destacó, en base a las proteínas identificadas, la cascada del complemento, tanto la parte inicial como la final, como una de las vías más representativa.

En línea con lo dicho anteriormente, cabe destacar la presencia de marcadores específicos de VEs, tanto para exosomas como para MVs, siendo también control de calidad del aislamiento de las mismas. En ese contexto, el 70-90% del total de MVs circulantes son derivados de plaquetas (111). En este estudio se identificaron diversos marcadores

específicos de MVs derivados de plaquetas como es el caso de CD41, integrin $\beta 3$ y CD61, apuntando a un enriquecimiento de vesículas procedentes de plaquetas. En el caso de los exosomas, se encontraron también una gran variedad de marcadores específicos como CD9, HS70 y HSPA8.

4.4.5 Análisis diferencial del proteoma de las VEs de pacientes obesos e individuos delgados mediante la técnica *Label Free* LC-MS/MS

Una vez analizado el perfil proteómico de las VEs, se realizó un análisis cuantitativo entre ambos grupos mediante la herramienta de software Progenesis Q1. Se detectaron un total de 22 proteínas únicas que variaban entre condiciones. Para poder identificar solapamientos con los resultados de 2D-DIGE, se utilizaron los mismos parámetros de corte (corte de *fold-change* $\geq 1,4$; p valor $< 0,05$). También se añadió al panel de proteínas la proteína Complemento C4b (*fold change*=1,18), ya que se identificó el otro isotipo de la familia C4 mediante la aproximación 2D-DIGE. La lista detallada se encuentra en la **Tabla 22**.

En cuanto al análisis cuantitativo, 14 de las 23 proteínas identificadas se encontraban sobreexpresadas en las vesículas de los pacientes obesos, mayoritariamente relacionadas con respuesta ante estrés (proteínas relacionadas con el complemento y fibrinógeno). Además, alrededor del 60% de las proteínas identificadas fueron

involucradas en hemostasia, coagulación y la cascada del complemento (Tabla 22).

Una de las proteínas alteradas fue el fibrinógeno, proteína que ya se vio alterada en el proteoma plaquetario de los obesos mediante 2D-DIGE. En esta aproximación se detectaron las tres cadenas aumentadas en las VEs de los pacientes obesos. Además de las proteínas descritas anteriormente, 9 se encontraron disminuidas en el grupo obeso, entre ellas la adiponectina.

Tabla 22: Estudio del proteoma de las VEs: lista de proteínas identificadas de manera diferencial mediante la técnica *Label Free* LC-MS/MS.

ORF	Nombre	Proceso Biológico	Vesiclepedia (178)	Ratio
ADIPO_HUMAN	<i>Adiponectin</i>	Diferenciación de células grasas	Si	-8,67
CD244_HUMAN	<i>Natural killer cell receptor 2B4</i>	Respuesta Inmune	No	-2,01
CFAB_HUMAN	<i>Complement factor B</i>	Activación del Complemento	Si	+2,9
CFAH_HUMAN	<i>Complement factor H</i>	Activación del Complemento	Si	+2,23
CO3_HUMAN	<i>Complement factor C3</i>	Respuesta Inflamatoria	Si	+1,42
CO4A_HUMAN	<i>Complement factor C4-A</i>	Respuesta Inflamatoria	Si	+1,18
CO9_HUMAN	<i>Complement component C9</i>	Activación del Complemento	Si	+3,19
DBLOH_HUMAN	<i>Diablo homolog, mitochondrial</i>	Proceso apoptótico	Si	-2,22
DCA12_HUMAN	<i>DDB1- and CUL4-associated factor 12</i>	Ubiquitinación proteica	Si	-3,36

FA5_HUMAN	<i>Coagulation factor V</i>	Coagulación	Si	-19,2
FCGBP_HUMAN	<i>IgGFC-binding protein</i>	-	Si	-1,55
FIBA_HUMAN	<i>Fibrinogen Alpha chain</i>	Agregación plaquetaria	Si	+1,45
FIBB_HUMAN	<i>Fibrinogen Beta chain</i>	Agregación plaquetaria	Si	+1,56
FIBG_HUMAN	<i>Fibrinogen Gamma chain</i>	Agregación plaquetaria	Si	+1,50
HBA_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit Alpha</i>	Transporte de oxígeno	Si	-1,87
HBB_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit beta</i>	Transporte de oxígeno	Si	-2,10
HEMO_HUMAN	<i>Hemopexin</i>	Producción de inmunoglobulinas	Si	+2,07
HEP2_HUMAN	<i>Heparin cofactor 2</i>	Coagulación	Si	+5,54
HYDIN_HUMAN	<i>Hydrocephalus-inducing protein homolog</i>	Movimiento de cilios	Si	+1,56
PSA5_HUMAN	<i>Proteasome subunit Alpha type-5</i>	Modificaciones post-traduccionales	Si	+5,58
SAMP_HUMAN	<i>Serum amyloid P-component</i>	Respuesta inflamatoria	Si	+2,73
SAXO1_HUMAN	<i>Stabilizer of axonemal microtubules 1</i>	Biogenesis/ Degradación Ciliar	No	-5,08
THRB_HUMAN	<i>Prothrombin</i>	Activación plaquetaria	Si	+2,52

a. Ratio: El ratio se representa grupo obeso frente a grupo control.

4.4.6 Biología de sistemas

Tras analizar el proteoma de las VEs por ambas aproximaciones proteómicas, el estudio global identificó un total de 40 proteínas únicas derivadas de VEs que se encontraban alteradas en obesidad. Ambas

técnicas muestran un grado de solapamiento, aunque muchas de las proteínas fueron exclusivamente identificadas en una de las técnicas.

Entre las proteínas solapadas se encuentra el complemento C3, complemento C4 (reconociendo ambos complementos C4a y C4b como C4 ya que ambos isotipos muestran un solapamiento en su secuencia del 99% (200) y fibrinógeno, todas ellas sobreexpresadas en las VEs de los pacientes obesos.

Tras identificar las proteínas diferenciales, se realizó un análisis de biología de sistemas combinando tanto el Cytoscape como IPA para descubrir potenciales vías de señalización que se encontraran alteradas. En el caso del IPA identificó la vía de señalización en respuesta a la fase aguda como la vía más alterada.

Por otro lado, análisis mediante Cytoscape mostró que 26 de las proteínas diferenciales formaban parte de una red común de proteínas (**Figura 44A**). Además, alrededor del 70% están descritas como proteínas procedentes de VEs (**Figura 44B**). Si se refiere a su función, un 75% de ellas están relacionadas con respuesta ante el estrés, un 20% con la activación del complemento y un 30% con la activación plaquetaria. Por último, 10 de las proteínas que se encontraron alteradas forman parte de la misma vía de señalización: la coagulación y la fibrinólisis, y la casca del complemento.

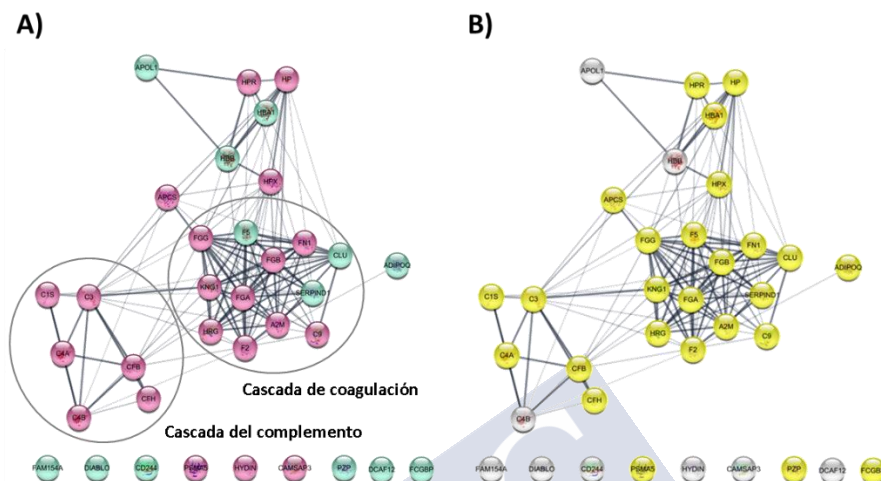


Figura 44: Análisis de biología de sistemas: alrededor del 70% de las proteínas reguladas de manera diferencial forman parte de una red común, la gran mayoría descrita en VEs. *Análisis con el Cytoscape-STRING: las proteínas reguladas de manera diferencial están representadas por el nombre del gen. Las líneas gruesas representan interacción directa mientras que las finas indirectas. (A) Las proteínas diferenciales se muestran en diferentes colores: rosa, aumentada en obesos y azul disminuidas. Las proteínas relacionadas con la cascada de la coagulación y del complemento están marcadas con un círculo. (B) Las proteínas descritas en las vesículas extracelulares están señaladas en amarillo.*

4.4.7 Validación del panel de biomarcadores vesiculares: Fibrinógeno y Complemento C3 por inmunodetección

Para corroborar la sobreexpresión de algunas proteínas claves de VEs implicadas en coagulación y cascada del complemento, se procedió a la validación de 2 de las proteínas solapadas mediante inmunodetección.

El hecho de que esas proteínas se encuentren sobreexpresadas en ambos métodos ya es una validación per se, ya que una técnica válida

a la otra. Sin embargo, se consideró reclutar a un tercer grupo de pacientes para validar mediante inmunodetección bidimensional el complemento C3 y el fibrinógeno utilizando pools de 5 individuos (obesos y sus controles delgados pareados por edad y sexo).

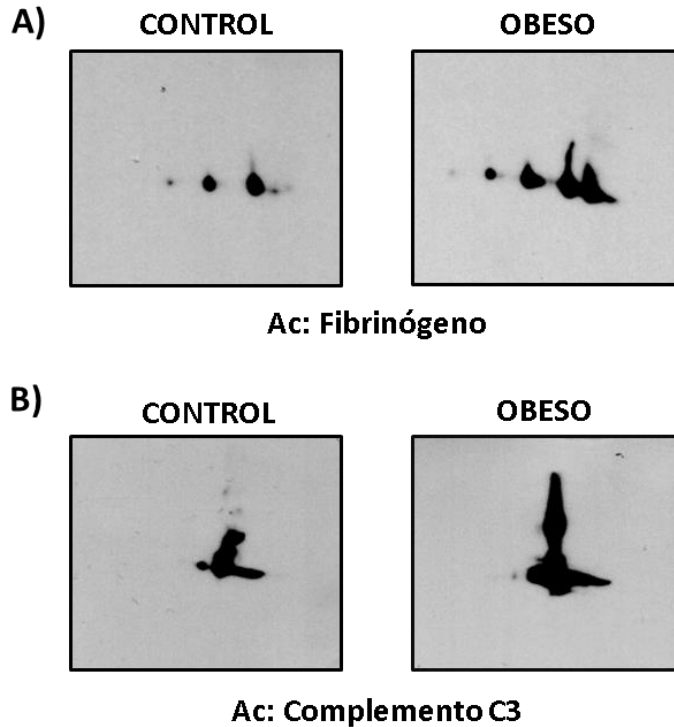


Figura 45: Las validaciones mediante inmunodetección confirma una elevación de fibrinógeno y complemento C3 en las VEs del grupo de obesos. (A) Imagen representativa de una inmunodetección bidimensional de fibrinógeno en pools de muestras de VEs (obesos y controles delgados, n=5 por grupo). (B) Imagen representativa de una inmunodetección bidimensional de complemento C3 en pools de muestras de VEs (obesos y controles delgados, n=5 por grupo). Las inmunodetecciones se realizaron en triplicado. Ac: anticuerpo.

Como se ha descrito anteriormente, el fibrinógeno es una de esas proteínas comunes y tiene gran relevancia en activación y agregación plaquetaria. En línea con los resultados obtenidos en la proteómica, se observó que las manchas de fibrinógeno estaban aumentadas en las muestras de los pacientes obesos (**Figura 45A**). Conjuntamente, se validaron también los niveles de expresión de complemento C3 donde se mostraban niveles de expresión similares a los datos proteómicos, donde el C3 estaba aumentado en el grupo de los obesos (**Figura 45B**).



5. DISCUSIÓN



La presente tesis lleva por título el impacto de la obesidad en la reactividad plaquetaria y su relación con la enfermedad coronaria. En ella, se realizó un estudio exhaustivo de la reactividad plaquetaria tanto a nivel proteómico, lipidómico, bioquímico y funcional de las plaquetas de pacientes con obesidad mórbida comparadas con las plaquetas de los controles delgados. Además, también se estudió el proteoma de las vesículas extracelulares (VEs) circulantes presente en el plasma de ambos grupos con vistas a obtener potenciales biomarcadores de riesgo aterotrombótico en obesidad.

Los principales hallazgos del estudio de la reactividad plaquetaria en obesidad fueron los siguientes: i) alteraciones en proteínas relacionadas con activación y agregación plaquetaria, especialmente proteínas relacionadas con las vías de señalización mediadas SFKs, por medio de aproximaciones proteómicas (2D-DIGE y fosfoproteómica); ii) validación de la proteína fibrinógeno, aumentada en las plaquetas de los obesos, mediante inmunodetección bidimensional; iii) incremento significativo de los niveles fosforilados de Src^{Y419} (forma activa) en los pacientes obesos, identificada por fosfoproteómica, proteómica dirigida e inmunodetección; iv) validación de proteínas relevantes en activación y agregación plaquetaria por medio de proteómica dirigida (VAMP^{S55}, Src^{Y419}, PCK^{θS695}, LAT^{S40/S43}), mostrando un aumento en las plaquetas de los individuos obesos; v) aumento significativo de los niveles fosforilados de PLCγ2 tras activar con CRP-XL (ligando específico de GPVI) en los

pacientes obesos; vi) incremento significativo en la agregación plaquetaria de los paciente obesos tras estimular las plaquetas con CRP-XL y colágeno (ligando de GPVI); vii) aumento significativo en los niveles de GPVI (total y dímero) y CLEC-2 en la superficie de las plaquetas de los pacientes obesos, ambos resultados correlacionado positivamente con el IMC; viii) incremento significativo en la adhesión a colágeno de las plaquetas de los pacientes obesos; ix) aumento significativo de los niveles de GPVI soluble (GPVIs), indicativo de una activación en la vía de GPVI, en los pacientes obesos; x) disminución significativa de los niveles de colesterol en la membrana plaquetaria de los individuos obesos; xi) reducción significativa de los niveles de fosfatidilinositol y ceramidas en las plaquetas de los pacientes obesos; xii) desarrollo de un modelo animal de obesidad (rata DIO) para el estudio de plaquetas; xiii) alteración niveles fosforilados de Src^{Y419} (forma activa) en las ratas DIO; xiv) incremento significativo en la adhesión a colágeno de las plaquetas de las rata DIO.

Los principales resultados del segundo objetivo, estudio de las VEs presentes en el plasma de pacientes obesos, fueron los siguientes: i) alteración de proteínas procedentes de VEs de pacientes obesos mediante las técnicas proteómicas basadas en 2D-DIGE y *label free* LC-MS/MS, respectivamente; iii) Aumento de proteínas relacionadas con la activación del complemento y coagulación en las VEs de los individuos obesos; iv) postulación de un panel de biomarcadores de riesgo cardiovascular formado por fibrinógeno, complemento C3 y C4

y adiponectina, las dos primeras con niveles aumentados en obesos y el último disminuido.

Con el fin de entender mejor los hallazgos de la presente tesis, la discusión se encuentra separada en diferentes subapartados correspondientes a los objetivos específicos.

5.1 ESTUDIO DEL IMPACTO DE LA OBESIDAD EN LAS PLAQUETAS

Desde un punto de vista de investigación plaquetaria, el interés por estudiar la posible correlación que existe entre la obesidad y la enfermedad coronaria ha crecido exponencialmente durante los últimos años. No obstante, apenas existen trabajos donde se describan alteraciones a nivel molecular de las plaquetas de individuos obesos. Recientemente, se ha demostrado que las plaquetas de los pacientes obesos en un estado basal presentan: diferentes patrones a nivel de ARNm, un aumento en niveles de ROS (especies reactivas de oxígeno) y una mayor agregación plaquetaria en respuesta a diferentes estímulos como colágeno (123, 143).

En este contexto, la presente tesis planteó estudiar en profundidad las plaquetas, tanto a nivel proteómico, lipidómico, bioquímico y funcional, de los pacientes con obesidad mórbida comparándola con controles delgados pareados por edad y sexo. Además, también se plateó desarrollar un modelo de rata obesa con el

objetivo de estudiar el impacto de la obesidad en un modelo controlado y correlacionar los resultados con los hallazgos obtenidos en humanos.

5.1.1 Estudio de los niveles de activación plaquetaria en obesidad

La obesidad es un factor de riesgo a la hora de desarrollar diferentes enfermedades cardiovasculares (ECV), como por ejemplo insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, hipertensión, disritmia y tromboembolismo venoso (122). Por ello, distintos grupos de investigación se han centrado en estudiar el papel que presentan las plaquetas en ese tipo de patología (123, 201). Uno de los objetivos principales que conforman la presente tesis doctoral es estudiar en profundidad las principales vías de activación plaquetaria en pacientes con obesidad mórbida para obtener información novedosa sobre potenciales dianas terapéuticas y biomarcadores de riesgo aterotrombótico en obesidad.

Para este estudio, se seleccionaron un total de 50 pacientes con obesidad mórbida y sus controles delgados pareados por edad y sexo. Los pacientes obesos no presentaban comorbilidades asociadas, evitando así el impacto de otras enfermedades en las plaquetas.

Como consecuencia del estado proinflamatorio y protrombótico, los pacientes obesos incluidos en el presente estudio mostraron alteraciones en diferentes parámetros plaquetarios. Así y de acuerdo con los datos clínicos, la cohorte completa de pacientes obesos (n=50) presentaba un aumento en el contejo plaquetario (PLT)

comparado con los individuos delgados ($n=47$). Este parámetro está directamente relacionado con un aumento de activación plaquetaria y de riesgo cardiovascular. De hecho, estudios recientes indican una correlación positiva del PLT con el IMC, la circunferencia de la cintura y el porcentaje de grasa corporal (135). Otro de los parámetros relacionados con función plaquetaria es el volumen plaquetario medio (VPM), donde existe gran discrepancia entre si existe o no correlación con la patología (129-134). Sorprendentemente, los datos clínicos muestran una disminución significativa en el VPM en la cohorte de pacientes obesos, aunque los niveles se encuentran dentro de los valores fisiológicos. Además, el grupo obeso también presenta mayores niveles de leucocitos en sangre, en línea con los resultados de un estudio reciente donde determinan los niveles de leucocitos y PLT como nuevos marcadores biológicos para la detección precoz de síndrome metabólico (202).

La ausencia de núcleo en las plaquetas, y en consecuencia su capacidad limitada de síntesis proteica, junto con la regulación de la actividad plaquetaria a nivel de modificaciones postraduccionales (PTMs), hacen de la proteómica una herramienta perfecta para su estudio (203). Por ello, se recurrió al estudio de las plaquetas en pacientes obesos por medio de dos aproximaciones proteómicas diferentes, 2D-DIGE y fosfoproteómica centrándose en fosforilaciones en serina, treonina y tirosina.

La técnica 2D-DIGE es una técnica proteómica basada en gel que permite la separación simultánea de 3 muestras a estudio, dos correspondientes las diferentes condiciones y otra al estándar interno (mezcla equitativa de ambas). Esta aproximación proporciona información valiosa del perfil proteico y de las posibles PTMs que existen en la muestra (203). Sin embargo, al ser una técnica basada en gel exhibe varias limitaciones como por ejemplo dificultades a la hora de identificar proteínas con pI extremos, proteínas con alto o bajo peso molecular, y proteínas transmembrana (204). El rango de pI utilizado fue de 4-7 ya que se ha demostrado que más del 85% del proteoma de las plaquetas se encuentra dentro de ese rango, además se eligieron geles grandes (24 x 20 cm) para aumentar la resolución del análisis (187).

Centrándonos en los resultados del proteoma plaquetario mediante la técnica 2D-DIGE, se encontraron alteraciones en proteínas relacionadas con señalización, agregación y activación plaquetaria en el grupo obeso. Más concretamente, el software de biología de sistemas IPA, indicó a la señalización mediada por las integrinas, como una de las vías más alteradas en obesidad. De hecho, algunas de las proteínas identificadas sobreexpresadas en las plaquetas de los pacientes obesos, como es el caso del TSP1 y fibrinógeno, se han encontrado también aumentadas en el plasma de individuos con la misma patología (199, 205, 206). TSP1 es uno de los principales componentes de los gránulos

α y recientemente se ha descrito como potencial mediador de resistencia a insulina e inflamación en obesidad (206).

Por lo que respecta al fibrinógeno, potencial biomarcador para obesidad y ECV (199), fue seleccionado para los estudios de validación dado su gran representación en el estudio. El fibrinógeno es un precursor de la fibrina, formado por tres cadenas polipeptídicas, α , β y γ , dos de las cuales (β y γ) se encontraron aumentadas en el estudio. En concreto, la cadena γ juega un papel fundamental en la agregación e inflamación plaquetaria, por lo que su aumento en las plaquetas del grupo obeso es de gran interés (207, 208). De hecho, estudios recientes han vinculado niveles circulantes elevados de la cadena γ del fibrinógeno con ECV (209, 210). Según los resultados proteómicos, se identificó fibrinógeno γ en 5 de las manchas, todas ellas sobreexpresadas en el grupo obeso. El aumento de los niveles de fibrinógeno en obesidad también se confirmó posteriormente por inmunodetección bidimensional.

El aumento de proteínas, tales como el fibrinógeno en las plaquetas procedentes de los pacientes obesos, es consistente con otros estudios llevados a cabo en pacientes obesos que determinaron niveles elevados de dicha proteína en el plasma (48, 123). Estos niveles podrían promover un estado hiperreactivo de diferentes vías de señalización plaquetaria, como es el caso de todas las relacionadas con la integrina α IIb β 3. Recientemente, se ha postulado también GPVI como receptor de fibrina y fibrinógeno (84, 86).

Los resultados obtenidos mediante 2D-DIGE apuntan a una posible alteración de vías de señalización plaquetaria mediadas por las SFKs, como es el caso de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y GPVI, en obesidad.

Como se ha mencionado anteriormente, la activación plaquetaria está mediada por fosforilaciones, tanto en serina y treonina como en tirosina. Por ello, en la presente tesis se planteó estudiar el fosfoproteoma global plaquetario en pacientes obesos para así comprender mejor los mecanismos asociados al impacto de la obesidad en las plaquetas. La metodología que se llevó a cabo fue el enriquecimiento peptídico por TiO_2 , acoplado al análisis posterior de los péptidos enriquecidos mediante *label free* LC-MS/MS. La técnica *label free* LC-MS/MS permite el análisis de muestras complejas, identificando cambios en la abundancia proteica entre condiciones considerándose una herramienta idónea para la búsqueda de biomarcadores.

Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis de existencia de hiperactivación plaquetaria en obesidad, puesto que todas las fosforilaciones que se encontraban diferencialmente reguladas estaban aumentadas en el grupo obeso. De hecho, considerando los resultados del estudio y la información previa sobre señalización plaquetaria, se elaboró una propuesta de los eventos intracelulares que suceden en las plaquetas de los pacientes con dicha patología, donde se incluyeron las principales proteínas identificadas que se regulaban de manera diferencial (**Figura 19**). Así pues, muchos de los sitios de fosforilación

y de las proteínas de señalización identificadas podrían tener gran relevancia clínica, convirtiéndose así en potenciales biomarcadores de riesgo cardiometabólico en obesidad. En este contexto, cabe destacar la presencia de un gran número de proteínas involucradas en vías de señalización mediadas por SFKs, como es el caso los receptores ITAM, GPVI y CLEC-2, y la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$.

Los resultados de fosfoproteómica también muestran una posible hiperactivación de la vía del receptor GPVI. Una vez se produce la adhesión de las plaquetas a el colágeno, se desencadena la fosforilación de numerosas proteínas que da lugar a la activación de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y la desgranulación plaquetaria (60). Así, en el presente estudio se encontraron fosfoproteínas de fase temprana de la vía de señalización de GPVI que estaban aumentadas en las plaquetas de los pacientes obesos, como por ejemplo Src^{Y419} , $\text{PKC}\alpha^{\text{S226}}$ y *Tom1-like protein* I^{S323} . Además, también se identificaron proteínas en fases más tardías de la vía de señalización, tales como $\text{LAT}^{\text{S40/S43}}$, GAD^{T262} , $\text{SLP-6}^{\text{S207}}$, que se encontraban aumentadas en el grupo obeso.

Las proteínas anteriormente detalladas están también involucradas y son comunes a otras vías de señalización ITAM, como CLEC-2, la cual podría estar también alterada en obesidad. CLEC-2 se considera un receptor plaquetario importante ya que presenta un función menor en hemostasia pero una gran contribución en la formación del trombo, además también se ha visto involucrado en otros procesos no asociados con función plaquetaria como separación

linfática, integridad vascular en inflamación, embriogénesis y metástasis (67).

Otros fosfopéptidos de señalización importantes involucradas en las vías mediadas por SFKs son Src^{Y419} y PKC θ ^{S695}, ambos sobreexpresados en el grupo obeso. De hecho, dichas proteínas se han descrito como importantes reguladoras en la transducción de la señal intracelular del receptor GPVI (57, 211).

La proteína Src es una tirosina quinasa de 60-kDa involucrada en transmitir señales en los estadios tempranos de la vía, a través de diferentes receptores tales como CLEC-2, integrina α IIb β 3 y especialmente GPVI. Tanto Src como otros miembros de la familia (Fyn y Lyn, entre otros) están regulados por fosforilaciones en tirosina siendo necesaria la fosforilación en el caso de Src del residuo Tir⁴¹⁹ para presentar actividad catalítica completa (57). Esta fosforilación concreta se encontró sobreexpresada en el grupo obeso mediante fosfoproteómica y posteriormente se confirmó mediante proteómica dirigida en una cohorte independiente (n=7). El empleo de un anticuerpo específico anti-Src (pTir⁴¹⁹) demostró que la forma activa de Src estaba sobreexpresada en plaquetas de un grupo independiente (n=29) de pacientes con obesidad mórbida comparado con sus controles delgados pareados por edad y sexo. Además, estudios recientes llevados a cabo por nuestro grupo de investigación demostraron una sobreexpresión de la forma activa de Src en una cohorte de pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del ST (IAMCEST)

(188). Estos resultados respaldan la idea de que Src^{Y419} podría ser un potencial biomarcador de activación plaquetaria en obesidad vinculado a eventos aterotrombóticos.

Una vez se produce la activación de GPVI, comienza la cascada de señalización dará lugar finalmente a la fosforilación de PLC γ 2 y con ello, la fosforilación de PKC θ (**Figura 19**). De acuerdo con los datos del estudio de fosfoproteómica, las plaquetas de los pacientes obesos presentan una hiperfosforilación de PKC θ en tres residuos del dominio catalítico (Tre⁵³⁶, Tre⁵³⁸ y Ser⁶⁹⁵). De hecho, tanto Tre⁵³⁸ (bucle de activación) como Ser⁶⁹⁵ (motivo hidrofóbico) son esenciales para la completa activación catalítica de la quinasa (211, 212). Conjuntamente, el residuo Ser⁶⁹⁵ fue validado mediante MS dirigida en una cohorte independiente de pacientes, mostrando también mayores niveles de fosforilación en el grupo obeso.

Dado que PLC γ 2 también es una de las proteínas clave en la vía señalización de GPVI, se estudiaron los niveles de fosforilación de dicha proteína después de estimular las plaquetas de ambos grupos con un agonista específico de GPVI (CRP-XL). Los resultados mostraron una hiperfosforilación de PLC γ 2 en las plaquetas de los pacientes obesos, confirmando un mayor estado de activación de la vía de GPVI en obesidad. El aumento de los niveles de fosforilación de dicha proteína también fue identificado anteriormente por nuestro grupo de investigación en pacientes IAMCEST (188).

Con vistas a comprender mejor los resultados derivados de las diferentes aproximaciones proteómicas y bioquímicas, se llevaron a cabo estudios funcionales de adhesión y agregación plaquetaria. De hecho, las plaquetas de los pacientes obesos mostraron una mayor agregación en respuesta a colágeno y al ligando específico de GPVI (CRP-XL) cuando se compararon con plaquetas de controles delgados. En este contexto, Leite y colaboradores también demostraron que las plaquetas de individuos obesos agregaban más en respuesta a colágeno que las delgadas (123). Asimismo y en línea con los resultados de agregación, se identificó que las plaquetas de los pacientes obesos presentaban una mayor adhesión a colágeno si se comparan con las plaquetas de los controles delgados. Por tanto, los resultados funcionales de agregación y adhesión plaquetaria confirman la existencia de una hiperactivación de la vía de señalización de GPVI en obesidad.

Para esclarecer los datos de una manera mecánica, se realizaron ensayos basados en citometría de flujo donde las plaquetas de los pacientes obesos mostraban mayores niveles de expresión de los receptores ITAM, especialmente GPVI, en la superficie de la membrana plaquetaria. Cabe resaltar que se observaron niveles de expresión superiores tanto en GPVI total, como en su forma dimérica (activa); ambos datos correlacionaron positivamente con el IMC. Además, el análisis de curvas ROC indicaron que los niveles de GPVI podrían convertirse en un potencial biomarcador de activación plaquetaria para

el uso clínico ya que es capaz de discriminar entre grupos (control y obeso).

Conjuntamente, los niveles de expresión de CLEC-2 también se encontraron alterados en el presente estudio. Esta alteración podría estar directamente vinculada con una mayor activación de la vía de señalización. De hecho, y en línea con estos resultados, Heffron y colaboradores demostraron que las plaquetas de los pacientes obesos presentaban los niveles de ARNm de este receptor aumentados, apuntando a una potencial disfunción de CLEC-2 (143). Por lo tanto, la alteración de los receptores ITAM en la superficie de las plaquetas, especialmente GPVI y CLEC-2, podría convertirse en una medida adicional del riesgo cardiometabólico y de la activación plaquetaria para su futura implantación en la práctica clínica.

Puesto que los resultados globales apuntan a una hiperactivación de la vía de señalización de GPVI en obesidad, se decidió medir los niveles de la GPVIs circulantes en plasma. Recientemente, los niveles de la forma soluble del receptor han servido como potencial biomarcador de activación plaquetaria (56). De hecho, niveles altos de GPVIs han sido asociados con niveles más bajos de GPVI en la superficie de las plaquetas (213, 214). Los resultados de la presente tesis doctoral muestran que, en el caso de la obesidad, tanto GPVIs como GPVI en la superficie de la membrana se encuentran aumentados. Una posible explicación es que dado el estado proinflamatorio y protrombótico que presentan los individuos obesos,

éstos tienden a tener la vía de GPVI alterada. En un intento de normalizar los niveles de GPVI en la superficie de las plaquetas, las metaloproteasas (MMPs) podrían intentar corregirlos liberando GPVIs (Figura 46) (56). Será necesario llevar a cabo más estudios para esclarecer por qué ambos niveles de GPVI se encuentran aumentados en esta patología.

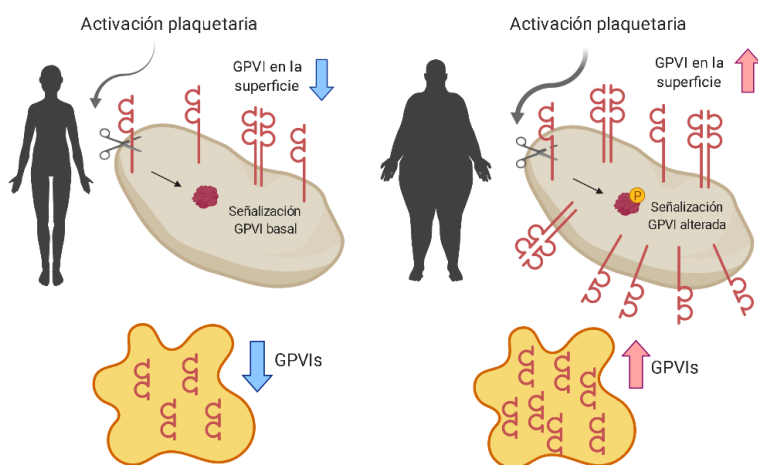


Figura 46: Representación gráfica de los resultados obtenidos mediante las diferentes aproximaciones (proteómicas, bioquímicas y funcionales) en las plaquetas del grupo obeso y el grupo control.

A modo de resumen, este estudio constituye el primer análisis que estudia en profundidad, tanto las proteínas como sus modificaciones postraduccionales, en las plaquetas de los pacientes con obesidad mórbida, siendo el primero que analiza en detalle el

fosfoproteoma plaquetario en un contexto clínico. El presente objetivo proporciona información novedosa sobre la alteración de las principales vías de señalización mediada por la familia de las SFKs, especialmente los receptores ITAM (**Figura 46**). Además, cobra un gran interés la hiperactivación selectiva de la vía de señalización de GPVI en las plaquetas de los pacientes obesos ya que es un hallazgo de interés que permite abrir las puertas a la realización de nuevos ensayos que puedan explorar el papel fisiopatológico de las plaquetas en obesidad. Además, los resultados mencionados anteriormente aportan una valiosa información para la búsqueda de posibles dianas terapéuticas y biomarcadores relacionados con el riesgo aterotrombótico en esta patología.

5.1.2 Estudio de los principales lípidos de la membrana plaquetaria en obesidad.

La importancia de estudiar los lípidos de las plaquetas radica en el papel fundamental que tienen dichos lípidos a la hora de mantener la fluidez de la membrana, participar en la liberación de vesículas y colaborar en múltiples funciones celulares. De hecho, el grupo de Raffaelli y colaboradores demostraron que las plaquetas de pacientes obesos presentan una disminución en la bomba de sodio/potasio y una alteración en la fluidez de la membrana (148).

Actualmente no existe ningún estudio que determine posibles variaciones en el lipidoma plaquetario en obesidad. Para alcanzar un

mayor conocimiento del impacto de la obesidad en la función plaquetaria y dado que se ha observado que existen alteraciones en el perfil proteico y en diferentes vías de señalización en obesidad, en la presente tesis doctoral se decidió estudiar los principales lípidos presentes en la membrana de las plaquetas con el fin de identificar alteraciones en los mismos en un grupo de pacientes obesos.

Los lípidos son moléculas pequeñas e moléculas hidrofóbicas que se encuentran en todo tipo de muestras. Su formación, transporte y metabolismo está controlado por proteínas celulares tales como fosfolipasas, sintetasas, ligasas, reductasas/oxidadas y proteínas transportadoras. Se puede decir que los lípidos poseen 3 funciones principales en la célula: estructural, almacenaje de energía y señalización (215).

Durante los últimos años, el desarrollo de nuevas tecnologías que permiten una alta sensibilidad y especificidad en la purificación y análisis de los lípidos ha permitido que el campo de la lipidómica haya cobrado un gran interés. En un contexto clínico, los lípidos son considerados como potenciales biomarcadores de pronóstico y diagnóstico de diversas enfermedades ya que presentan diferencias en los perfiles lipídicos dependiendo de la patología que presenten (216).

La membrana de las plaquetas está formada por diversas variedades de lípidos. Los lípidos más abundantes son el colesterol y la esfingomielina de hecho, existen regiones de membrana relacionadas con señalización intracelular (balsas lipídicas) que están enriquecidas

en dichos lípidos. También, existen niveles apreciables de otros lípidos neutros, entre los que se encuentran el diacilglicerol (DAG) y los triglicéridos. Por último, pequeñas cantidades de otros lípidos (esfingolípidos y glucolípidos/ceramidas), importantes en señalización, se han descrito en la membrana de las plaquetas (215). Por ello el objetivo principal del presente estudio fue determinar los niveles de los principales lípidos de la membrana plaquetaria, colesterol, fosfolípidos y ceramidas, entre otros, en obesidad.

Como se ha descrito anteriormente, las plaquetas participan en diferentes funciones tales como hemostasia y trombosis. Para realizar esas funciones de manera correcta, los lípidos de la membrana plaquetaria tienen que distribuirse dentro de un equilibrio permitiendo mantener una fluidez dentro de los procesos (190). De hecho, durante el proceso de activación, las plaquetas se someten a un cambio de forma que da lugar a la liberación de microvesículas y a la desgranulación plaquetaria, donde los principales responsables son los lípidos, con la ayuda de proteínas estructurales (ej. actina, filamina, gelsolin) (190).

La fluidez de la membrana plasmática es una propiedad que está asociada con la organización molecular, y que se ve afectada por diferentes lípidos tales como colesterol, fosfolípidos y la composición de ácidos grasos. Cabe destacar que la fluidez y la microviscosidad de la membrana plaquetaria están relacionada con la agregación y activación plaquetaria. Estudios recientes determinaron que el aumento de la microviscosidad de la membrana plaquetaria está asociado con

una hiperactividad plaquetaria en enfermedades como diabetes, infarto agudo de miocardio y obesidad (217, 218)

Los lípidos neutros son un grupo muy representado en la membrana plaquetaria, de hecho más del 90% de este grupo está formado por el colesterol, necesario para la regulación de las balsas lipídicas (219). En relación con los resultados obtenidos, las plaquetas de los individuos obesos presentan niveles más bajos de colesterol que las plaquetas de los individuos delgados. Este fenómeno está relacionado con un cambio en la fluidez de la membrana y una alteración en las balsas lipídicas (190). Esta alteración da lugar a la sobreexpresión de otras proteínas implicadas en la estructura y función de las balsas lipídicas (190). En cambio, no se observaron diferencias significativas en los niveles del colesterol libre en plasma, por lo que la disfunción está relacionada solo a nivel plaquetario. En el caso de los triglicéridos, no se observaron diferencias significativas en el grupo obeso, aunque se vio una tendencia en el aumento de triglicéridos en obesidad.

Las ceramidas se conocen por su papel en la señalización dependiente de las balsas lipídicas, aunque también podrían ser potenciales mensajeros intracelulares en diferentes vías de señalización (220). Los resultados obtenidos muestran una disminución de los niveles de ceramidas en obesidad. Estos resultados son reforzados por diferentes estudios que apuntan una reducción de los niveles de

ceramidas en la membrana plaquetaria cuando esta responde a un agonista como trombina (221, 222).

En el caso del fosfatidilinositol (PIs), representan el 10-15% de los lípidos de membrana y son moléculas esenciales para la transducción de señales, remodelación del citoesqueleto y tráfico de vesículas. También pueden actuar como segundos mensajeros o directamente como mediadores lipídicos en la activación plaquetaria (223). Estudios recientes determinan que los niveles de PI en la membrana plaquetaria disminuyen después de la estimulación con diferentes agonistas (CRP-XL y trombina), tanto en humanos como en un modelo animal de ratón (223). En este contexto, en la presente tesis se observaron niveles más bajos de PI en las plaquetas de pacientes obesos, apuntando a una hiperactivación de las mismas.

El resto de los lípidos identificados no mostraron diferencias significativas entre grupos. Bien es cierto que se muestra una tendencia hacia la disminución de los niveles de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomielina (SM) y fosfatidilserina (PS) en la membrana plaquetaria de los individuos obesos. Una de las posibles explicaciones de no encontrar diferencias significativas puede ser debido a la alta variabilidad entre individuos y que tratan de plaquetas en reposo. Serán necesarios estudios futuros en una cohorte más grande de pacientes para esclarecer el papel de estos lípidos en las plaquetas.

En resumen, este estudio supone el primer y más completo análisis de los principales lípidos de la membrana en plaquetas de pacientes obesos. Cabe destacar que las plaquetas de los pacientes obesos presentan un perfil lipídico distinto, manifestado por una disminución significativa de colesterol, ceramidas y fosfatidilinositol si se comparan con la de individuos delgados. En concreto, esta disminución de los principales lípidos viene asociada a un aumento de la microviscosidad de la membrana plaquetaria que da lugar a un estado hiperactivo en las plaquetas obesas. Este hallazgo sienta las bases con el objetivo de poder explorar los lípidos de la membrana plaquetaria como posibles biomarcadores de riesgo cardiovascular en obesidad.

5.1.3 Establecimiento de un modelo de rata obesa para el estudio de las plaquetas en obesidad.

La importancia de establecer un modelo de rata obesa inducida por dieta (DIO) radica en su potencial como herramienta para ensayar nuevas terapias para la prevención y tratamiento de la patología. La contribución de múltiples factores en el desarrollo de la obesidad hace que sea difícilmente modelable *in vitro*, por lo que el uso de modelos animales es de gran ayuda. Durante los últimos años, diversos grupos de investigación han empleado el modelo animal DIO para comprender mejor el desarrollo y las complicaciones metabólicas asociadas al aumento de peso (193). En concreto, el objetivo de este apartado de la tesis doctoral fue establecer un modelo de rata DIO para el estudio de

plaquetas y correlacionar los datos obtenidos con los resultados en pacientes obesos.

Actualmente, existe una gran variedad de modelos animales que permiten el estudio de la obesidad pudiendo clasificarse en dos grupos: obesidad por mutaciones monogénicas (ej. ratas Zucker) o animales poligénicos (ej. ratas DIO). Los animales con mutaciones monogénicas ya sean espontaneas o inducidas, son un modelo ideal para estudiar aspectos referidos a la ingesta. Fue en 1961 cuando Zucker y colaboradores observaron un fenotipo obeso en ratas debido a una mutación espontánea en el gen del receptor de la leptina (224). No obstante, este tipo de mutaciones solo está presente en un grupo limitado de pacientes obesos, haciendo este modelo poco adecuado para mimetizar la patología (225).

Otro modelo de rata utilizado en el estudio de la obesidad es el de la rata DIO. Este modelo se caracteriza por reproducir los mecanismos fisiológicos que dan lugar a la obesidad y al síndrome metabólico en humanos utilizándose normalmente en estudios relacionados con la fisiopatología de la enfermedad, el papel de la dieta, y estudios farmacológicos (226).

Las dietas altas en grasa durante un tiempo prologado desencadenan un aumento de peso en el individuo y por consecuencia un aumento del tejido adiposo (227, 228). En línea con los resultados obtenidos, el aumento de la circunferencia abdominal y torácica en la rata obesa tiene una implicación patológica, ya que la acumulación de

grasa en la parte superior del cuerpo está relacionada con el desencadenamiento de trastornos metabólicos (228). Por tanto, este modelo de rata DIO permite simular las particularidades propias de la patología en humanos, caracterizando y monitorizando el aumento de peso debido a una dieta alta en grasa. Puesto que la finalidad del presente estudio es poder validar el modelo animal y correlacionar los resultados con los datos obtenidos en humanos sin comorbilidades asociadas, el uso del modelo de rata DIO es clave y se adapta perfectamente a los objetivos principales de esta investigación.

Uno de los principales problemas en el uso de modelos animales es optimizar la técnica de extracción de sangre y aislamiento de plaquetas para conseguir resultados reproducibles entre laboratorios. Actualmente, los protocolos descritos en la literatura son contradictorios y describen una gran variedad de métodos de extracción con distinto uso de anticoagulantes y métodos de aislamiento de plaquetas (229). Además, son pocos los grupos de investigación que han intentado desarrollar un protocolo eficaz que evite una preactivación espontánea de las plaquetas tras el procedimiento de aislamiento (186, 197, 229). Esto sumado a que tampoco existen muchos grupos que estudien plaquetas en rata, hace que el elaborar un protocolo detallado y eficaz de aislamiento de plaquetas de rata sea fundamental en este modelo animal.

Dado que las plaquetas de las ratas presentan similitudes con las de ratón, se combinaron diferentes protocolos, previamente testados en ratones, para diseñar el procedimiento (186, 197).

Los métodos de extracción de sangre más comunes en ratón son la punción cardiaca y la punción en la vena cava ya que se obtiene una cantidad más adecuada de muestra comparado con otros métodos. No obstante, un estudio llevado a cabo por Jirouskova y colaboradores determinó que la punción cardiaca podía desgarrar parte del músculo cardiaco durante la extracción y por consiguiente generar liberación de trombina desencadenando una activación plaquetaria espontánea (229). Cabe destacar que las ratas obesas presentan un exceso de grasa que dificulta la localización del corazón sin abrir la cavidad torácica, es por ello que se decidió realizar la extracción de sangre por la vena cava ya que permite la visualización de la misma a la hora de hacer la punción. Además, es uno de los métodos por excelencia en los trabajos en modelo animal, ya que permite obtener gran cantidad de sangre, y la vena es de fácil acceso por lo que evita una activación espontánea de las plaquetas en comparación con otros métodos (197, 229).

Durante la puesta a punto del procedimiento se probaron agujas de diferente calibre para ver cual se adaptaba mejor al método de extracción, siendo la 21G la más óptima en términos de tamaño, calibre y manipulación. De hecho, un estudio llevado a cabo por Pedersen y colaboradores mostró que no existían diferencias significativas en la activación plaquetaria (menos del 10%) cuando se comparaba sangre

extraída por agujas de diferente calibre (19G y 21G), siendo ambas adecuadas para el estudio de plaquetas (230).

Otro aspecto a considerar durante el desarrollo metodológico es la elección del anticoagulante, que se consideró en función de los objetivos principales del estudio. Tal y como se describe en la bibliografía, para obtener parámetros clínicos tales como PLT y VPM, normalmente se utiliza el anticoagulante EDTA (231). No obstante, la heparina se utiliza en ensayos funcionales con sangre o PRP, y el citrato sódico para estudios de señalización plaquetaria con plaquetas lavadas o PRP. En el caso del presente estudio de la tesis doctoral, se empleó una combinación de dos anticoagulantes (citrato sódico y ACD) durante el protocolo de aislamiento plaquetario. Esta metodología se utiliza especialmente para estudios de proteínas fosforiladas ya que permite una gran concentración de plaquetas minimizando su activación gracias al empleo de prostaciclina PGI_2 (231).

Tras la evaluación de la extracción de sangre, se determinó fue método de aislamiento de plaquetas para el modelo animal de rata. Durante años, los métodos empleados en humanos han sido adaptados para los diferentes modelos animales. El protocolo que se utilizó en el presente estudio se basó en centrifugaciones seriadas evitando la contaminación con otras células sanguíneas y la activación espontánea de las plaquetas. Dado que el tamaño plaquetario es similar entre rata y ratón, se decidieron adaptar las velocidades de centrifugación a partir de una guía diseñada para ratón (232). Además, durante el protocolo de

aislamiento se tuvieron en cuenta dos parámetros: la eficiencia y la reproducibilidad entre muestras. Atendiendo a los resultados obtenidos, la metodología empleada permitió un alto grado de reproducibilidad entre grupos, además de una pureza de más del 99% en plaquetas lavadas.

La importancia del uso de animales en investigación para el estudio de los mecanismos por los cuales se desarrolla una patología es un hecho. La obesidad induce diferentes alteraciones metabólicas e inflamatorias que pueden contribuir a la aparición de eventos cardiovasculares donde las plaquetas juegan un papel importante. En la bibliografía, son pocos los estudios que utilizan un modelo animal de rata obesa para estudiar la disfunción plaquetaria en obesidad. No obstante, se han descrito diferentes biomarcadores de riesgo protrombótico y proinflamatorio, como es el caso de PLT, en otro modelo de rata obesa (rata Zucker) (233). En línea con lo anterior, Kretus y colaboradores demostraron que las plaquetas de cerdos obesos inducidos por dieta alta en grasa agregaban más en respuesta a colágeno que aquellos cerdos delgados, apuntando a una alteración en la reactividad plaquetaria (146).

Por tanto, cabe mencionar que los resultados obtenidos en el modelo de rata obesa correlacionaron con los datos en pacientes obesos, donde se detectó una alteración de la forma activa de Src (Tir⁴¹⁹) y una mayor adhesión a colágeno en obesidad. Estos hallazgos permiten validar la técnica de extracción y el aislamiento en un modelo animal,

además de consolidar los resultados obtenidos en humanos en un modelo de rata obesa, confirmando una hiperactivación de la vía de señalización de GPVI en obesidad.

5.2 ESTUDIO LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DEL PLASMA EN OBESIDAD

En los últimos años, las vesículas extracelulares (VEs) circulantes en plasma procedentes virtualmente de cualquier célula o tejido han sido descritas como fuente de biomarcadores de diferentes enfermedades entre ellas la obesidad. De hecho, diferentes estudios muestran que los niveles de VEs se encuentran aumentados en dicha patología (111, 234). Por ello, el último apartado que conforma la presente tesis doctoral se centra en el estudio del proteoma de las VEs de pacientes obesos comparadas con sus controles delgados. La importancia de este estudio reside en ser el primer análisis proteómico de VEs circulantes en pacientes obesos que combina dos abordajes complementarios (2D-DIGE y *label free* LC-MS/MS), aportando información relevante sobre potenciales biomarcadores de riesgo aterotrombótico en obesidad.

La combinación de dos técnicas proteómicas como 2D-DIGE y *label free* LC-MS/MS permitió aumentar la capacidad del análisis y obtener resultados fiables ya que una técnica puede validar a la otra (235). No obstante, la técnica 2D-DIGE precisa de gran cantidad de proteína, lo que exige la utilización de *pools* cuando la cantidad de muestra es limitada, como es el caso de VEs. Por ello, la combinación

de ambas tecnologías permitió de manera eficaz la identificación de diversas proteínas relevantes presentes en VEs para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades cardiovasculares en obesidad.

Dada la complejidad del estudio, las dos aproximaciones proporcionan información complementaria ya que aquellas proteínas reguladas de manera diferencial y que aparecen en ambas metodologías, podrían considerarse muy relevantes puesto que un método valida al otro. En relación con los resultados obtenidos, se propuso un panel de biomarcadores basado en las proteínas comunes identificadas por ambas aproximaciones proteómicas (complemento C3, complemento C4 y fibrinógeno). Además, también se añadió al panel adiponectina ya que los resultados fueron respaldados por la bibliografía, mostrando una disminución de dicha proteína en el plasma de los pacientes obesos (Tabla 23).

Tabla 23: Resumen del panel de proteínas derivadas de VEs identificadas en ambas aproximaciones

Panel de Biomarcadores	2D-DIGE	LC-MS/MS
Complemento C4	Si	Si
Complemento C3	Si	Si
Fibrinogeno	Si	Si
Adiponectina	Si	No

La mayoría de las proteínas identificadas en el presente estudio estaban relacionadas con la cascada del complemento (ej. complemento C3, complemento C4, complemento C9, complemento H, y

complemento B). La cascada del complemento forma parte del sistema inmunitario y juega un papel importante en la regulación de la inflamación (236). De hecho, diferentes estudios han demostrado que pacientes con obesidad y síndrome metabólico presentan alteraciones en la cascada del complemento las cuales puede ser causadas por el estado proinflamatorio y protrombótico que presenta el individuo obeso (236-240). En el presente estudio, las dos aproximaciones proteómicas mostraron un aumento de los niveles de complemento C3 en las VEs procedentes de los individuos obesos, siendo el complemento C3 una proteína fundamental para la señalización del complemento e inflamación (236). Recientemente, se ha postulado el complemento C3 como posible biomarcador de riesgo cardiovascular(237, 238, 241); esto es debido a la correlación positiva que existe entre los niveles de complemento C3 circulantes y el IMC (242).

Otra proteína relevante identificada en el estudio es Complemento C4 ya que se encontraron sobreexpresados los niveles C4a y C4b en las VEs de los pacientes obesos. El complemento C4 está compuesto por dos isotipos previamente citados (C4a y C4b) que comparten más del 99% de la secuencia génica, difiriendo solo en su eficacia a la hora de unirse a otras proteínas (243). El complemento C4 forma parte de la cascada del complemento y conduce a la activación de C3 durante la señalización del complemento tanto la vía de clásica y la vía de la lectina. Asimismo, se ha demostrado que los niveles del complemento C4 están asociados también a un aumento del IMC (236).

Cabe mencionar que el ratio C3/C4 se ha considerado como un indicador potencial de enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico en obesidad (244).

Como ya se ha mencionado, la obesidad se caracteriza por presentar varios factores de coagulación elevados, afectando principalmente a la cascada de coagulación y fibrinólisis (131). En este contexto, en el presente estudio se observaron en los individuos obesos niveles elevados de fibrinógeno, protrombina y cofactor II de la heparina. En el caso del fibrinógeno, ambas aproximaciones detectaron un aumento de dicha proteína en las VEs procedentes de pacientes obesos. Mediante el uso de *label free* LC-MS/MS, se identificaron las 3 cadenas de la proteína aumentada en obesidad. En el caso de la técnica 2D-DIGE, se identificaron también todas las cadenas del fibrinógeno: la isoforma α se encontraba aumentada en el grupo obeso, la isoforma β disminuida, y la isoforma γ , dos manchas aumentadas y dos disminuidas. La contradicción de la isoforma β puede venir dada porque la mancha correspondiente a esa isoforma contenía también α -2-macroglobulina, pudiendo enmascarar el resultado.

El fibrinógeno también se validó mediante inmunodetección bidimensional, observándose una sobreexpresión de la proteína en una cohorte independiente de pacientes obesos. Esta proteína también se encontró aumentada en VEs de pacientes IAMCEST, estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación (245). El aumento de los niveles de esta proteína sugiere que las VEs participan en la

hiperactivación plaquetaria responsable principalmente de los eventos aterotrombóticos e inflamatorios (246). Además, Zhang y colaboradores mostraron que las microvesículas (MVs) de pacientes con DMT2 presentaban niveles más altos de fibrinógeno y p-Selectina si se comparan con un grupo control (247). En conjunto, el fibrinógeno se ha descrito como potencial marcador biológico en obesidad y ECV (46).

La adiponectina es una importante adipocina que está implicada en procesos como el metabolismo de lípidos y glucosa, inflamación y estrés oxidativo. De hecho, la adiponectina ha sido relacionada con la obesidad, asociando un aumento de dicha proteína con una disminución del riesgo cardiovascular, por su papel cardioprotector (46). En el presente estudio, se identificaron niveles más bajos de adiponectina en las VEs de los pacientes obesos por medio de la técnica *label free* LC-MS/MS, aumentando el riesgo cardiovascular. Cabe destacar la importancia de detectar dicha proteína en las VEs en lugar de libre en el plasma, ya que la liberación de VEs es normalmente dependiente de la condición fisiopatológica que presenta el individuo, y por tanto su identificación en las VEs será mucho más específica de la condición patológica. Además, Karkeni y colaboradores identificó niveles de miRNA-155 en adipocitos asociados a inflamación, demostrando que ese miRNA permitía aumentar los niveles de adiponectina (248).

En cuanto a las limitaciones del estudio de VEs cabe destacar que la función atribuida a las proteínas mencionadas está basada en su función celular, ya que no se conoce su papel como proteína vesicular. Por ello, estudios futuros se deberán abordar para poder determinar el papel específico de esas proteínas procedentes de VEs circulantes en obesidad.

En resumen, el estudio de VEs en obesidad muestra información novedosa aportando un potencial panel de biomarcadores de riesgo aterotrombótico en obesidad. Este hallazgo sugiere que los pacientes obesos presentan un riesgo cardiovascular que se debe tener en cuenta y destaca la importancia de considerar las VEs como fuente de biomarcadores para la prevención temprana de enfermedades cardiovasculares en este tipo de pacientes. Este estudio abre nuevas líneas de investigación para explorar el papel fisiopatológico de las VEs en obesidad.



6. CONCLUSIÓN



6.1 ESTUDIO DEL IMPACTO DE LA OBESIDAD EN LAS PLAQUETAS

1. Los estudios de proteómica muestran una sobreexpresión de proteínas relacionadas con la agregación y la activación plaquetaria en las plaquetas de los individuos obesos.
2. Los estudios de fosfoproteómica revelan una hiperfosforilación de proteínas en las plaquetas de los pacientes obesos, apuntando hacia una alteración de las principales vías de señalización mediadas por SFKs, y especialmente GPVI.
3. Los estudios funcionales y bioquímicos confirman que existe una sobreactivación de la vía de señalización de GPVI en las plaquetas de los pacientes obesos.
4. Los niveles de GPVI en la superficie de la membrana plaquetaria y GPVIs se encuentran aumentados en obesidad.
5. Los estudios de lipidómica indican que los principales lípidos de la membrana plaquetaria (colesterol, CER y PI), se encuentran disminuidos en las plaquetas de los individuos obesos, favoreciendo una hiperactivación plaquetaria,
6. Se ha establecido un protocolo estandarizado de extracción y aislamiento de plaquetas en un modelo animal de rata obesa
7. El modelo animal DIO simula adecuadamente la obesidad y muestra una alteración de las vías mediadas por SFK, especialmente GPVI, en línea con los resultados obtenidos en humanos.



6.2 ESTUDIO DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PROCEDENTES DEL PLASMA EN OBESIDAD

1. Los estudios proteómicos revelan información novedosa sobre proteínas relevantes involucradas en la cascada del complemento y la coagulación que se encuentran aumentadas en VEs de individuos obesos
2. Se propone un panel de biomarcadores de riesgo aterotrombótico en obesidad compuesto por las siguientes proteínas presentes en Ves circulantes: complemento C3, complemento C4, fibrinógeno y adiponectina, las tres primeras sobreexpresadas en obesidad y la última disminuida.



7. BIBLIOGRAFÍA



1. Lakka HM, Lakka TA, Tuomilehto J, Salonen JT. Abdominal obesity is associated with increased risk of acute coronary events in men. *Eur Heart J*. 2002;23(9):706-13.
2. López De La Torre M, Bellido Guerrero D, Vidal Cortada J, Soto González A, García Malpartida K, Hernandez-Mijares A. [Distribution of waist circumference and waist-to-height ratio by categories of body mass index in patients attended in endocrinology and nutrition units]. *Endocrinol Nutr*. 2010;57(10):479-85.
3. Lee CM, Huxley RR, Wildman RP, Woodward M. Indices of abdominal obesity are better discriminators of cardiovascular risk factors than BMI: a meta-analysis. *J Clin Epidemiol*. 2008;61(7):646-53.
4. Corrêa MM, Facchini LA, Thumé E, Oliveira ERA, Tomasi E. The ability of waist-to-height ratio to identify health risk. *Rev Saude Publica*. 2019;53:66.
5. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2000;894:i-xii, 1-253.
6. Kuno T, Tanimoto E, Morita S, Shimada YJ. Effects of Bariatric Surgery on Cardiovascular Disease: A Concise Update of Recent Advances. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:94.
7. Ogden CL, Carroll MD, Fryar CD, Flegal KM. Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2011-2014. *NCHS Data Brief*. 2015(219):1-8.

8. Aranceta-Bartrina J, Pérez-Rodrigo C, Alberdi-Aresti G, Ramos-Carrera N, Lázaro-Masedo S. Prevalence of General Obesity and Abdominal Obesity in the Spanish Adult Population (Aged 25-64 Years) 2014-2015: The ENPE Study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016;69(6):579-87.
9. Verma S, Hussain ME. Obesity and diabetes: An update. *Diabetes Metab Syndr*. 2017;11(1):73-9.
10. Organization WH. *Obesity and overweight* . <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> 2018 [
11. Meldrum DR, Morris MA, Gambone JC. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will? *Fertil Steril*. 2017;107(4):833-9.
12. Poddar M, Chetty Y, Chetty VT. How does obesity affect the endocrine system? A narrative review. *Clin Obes*. 2017;7(3):136-44.
13. Friedman JM. Leptin and the regulation of body weigh. *Keio J Med*. 2011;60(1):1-9.
14. Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr*. 1987;45(1 Suppl):277-82.
15. Stephens JM. The fat controller: adipocyte development. *PLoS Biol*. 2012;10(11):e1001436.
16. Casteilla L, Pénicaud L, Cousin B, Calise D. Choosing an adipose tissue depot for sampling: factors in selection and depot specificity. *Methods Mol Biol*. 2008;456:23-38.

17. McGown C, Birerdinc A, Younossi ZM. Adipose tissue as an endocrine organ. *Clin Liver Dis.* 2014;18(1):41-58.
18. Blüher M. Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Metab J.* 2012;36(5):317-27.
19. Bjørndal B, Burri L, Staalesen V, Skorve J, Berge RK. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes.* 2011;2011:490650.
20. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes.* 2009;58(7):1526-31.
21. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359.
22. Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord.* 2015;13(10):423-44.
23. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(11):633-43.
24. Izaola O, de Luis D, Sajoux I, Domingo JC, Vidal M. [Inflammation and obesity (lipoinflammation)]. *Nutr Hosp.* 2015;31(6):2352-8.
25. Festa A, D'Agostino R, Williams K, Karter AJ, Mayer-Davis EJ, Tracy RP, et al. The relation of body fat mass and distribution to

markers of chronic inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001;25(10):1407-15.

26. Hermsdorff HH, Zulet MA, Puchau B, Martínez JA. Central adiposity rather than total adiposity measurements are specifically involved in the inflammatory status from healthy young adults. *Inflammation*. 2011;34(3):161-70.

27. Pratley RE, Wilson C, Bogardus C. Relation of the white blood cell count to obesity and insulin resistance: effect of race and gender. *Obes Res*. 1995;3(6):563-71.

28. Reyes M, Quintanilla C, Burrows R, Blanco E, Cifuentes M, Gahagan S. Obesity is associated with acute inflammation in a sample of adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2015;16(2):109-16.

29. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med*. 2007;356(3):213-5.

30. Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Reaven GM. Resistance to insulin suppression of plasma free fatty acid concentrations and insulin stimulation of glucose uptake in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64(1):17-21.

31. Ravussin E, Smith SR. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;967:363-78.

32. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002;23(2):201-29.
33. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):85-97.
34. Nimptsch K, Pischon T. Body fatness, related biomarkers and cancer risk: an epidemiological perspective. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015;22(2):39-51.
35. Nimptsch K, Pischon T. Obesity Biomarkers, Metabolism and Risk of Cancer: An Epidemiological Perspective. *Recent Results Cancer Res.* 2016;208:199-217.
36. Byers T, Sedjo RL. Does intentional weight loss reduce cancer risk? *Diabetes Obes Metab.* 2011;13(12):1063-72.
37. Thompson HJ, McTiernan A. Weight cycling and cancer: weighing the evidence of intermittent caloric restriction and cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4(11):1736-42.
38. Berger NA. Obesity and cancer pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1311:57-76.
39. Wong JR, Gao Z, Merrick S, Wilson P, Uematsu M, Woo K, et al. Potential for higher treatment failure in obese patients: correlation of elevated body mass index and increased daily prostate deviations from the radiation beam isocenters in an analysis of 1,465 computed tomographic images. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;75(1):49-55.

40. Griggs JJ, Mangu PB, Temin S, Lyman GH. Appropriate Chemotherapy Dosing for Obese Adult Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Oncol Pract.* 2012;8(4):e59-e61.
41. Piché ME, Poirier P, Lemieux I, Després JP. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. *Prog Cardiovasc Dis.* 2018;61(2):103-13.
42. Sanz J, Fuster V. The year in atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(8):779-91.
43. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1983;67(5):968-77.
44. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, et al. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* 1990;322(13):882-9.
45. Csige I, Ujvárosy D, Szabó Z, Lőrincz I, Paragh G, Harangi M, et al. The Impact of Obesity on the Cardiovascular System. *J Diabetes Res.* 2018;2018:3407306.
46. Vilahur G, Ben-Aicha S, Badimon L. New insights into the role of adipose tissue in thrombosis. *Cardiovasc Res.* 2017.
47. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular

inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA*. 2003;289(14):1799-804.

48. Csongrádi É, Káplár M, Nagy B, Koch CA, Juhász A, Bajnok L, et al. Adipokines as atherothrombotic risk factors in obese subjects: Associations with haemostatic markers and common carotid wall thickness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017;27(6):571-80.

49. Kumari R, Kumar S, Kant R. An update on metabolic syndrome: Metabolic risk markers and adipokines in the development of metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr*. 2019;13(4):2409-17.

50. Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(7):461-70.

51. Rega-Kaun G, Kaun C, Wojta J. More than a simple storage organ: adipose tissue as a source of adipokines involved in cardiovascular disease. *Thromb Haemost*. 2013;110(4):641-50.

52. Machlus KR, Italiano JE. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J Cell Biol*. 2013;201(6):785-96.

53. Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood*. 2015;126(5):582-8.

54. Vilahur G, Gutiérrez M, Arzanauskaite M, Mendieta G, Ben-Aicha S, Badimon L. Intracellular platelet signalling as a target for drug development. *Vascul Pharmacol*. 2018;111:22-5.

55. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost.* 2011;9 Suppl 1:92-104.
56. Chatterjee M, Gawaz M. Clinical significance of receptor shedding-platelet GPVI as an emerging diagnostic and therapeutic tool. *Platelets.* 2017;28(4):362-71.
57. Senis YA, Mazharian A, Mori J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood.* 2014;124(13):2013-24.
58. Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC. GPVI and integrin α IIb β 3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1752-62.
59. Peters CG, Michelson AD, Flaumenhaft R. Granule exocytosis is required for platelet spreading: differential sorting of α -granules expressing VAMP-7. *Blood.* 2012;120(1):199-206.
60. Berndt MC, Metharom P, Andrews RK. Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia.* 2014;20 Suppl 4:15-22.
61. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):60-71.
62. Cho MJ, Liu J, Pestina TI, Steward SA, Thomas DW, Coffman TM, et al. The roles of α IIb β 3-mediated outside-in signal transduction, thromboxane A₂, and adenosine diphosphate in collagen-induced platelet aggregation. *Blood.* 2003;101(7):2646-51.

63. Aburima A, Wraith KS, Raslan Z, Law R, Magwenzi S, Naseem KM. cAMP signaling regulates platelet myosin light chain (MLC) phosphorylation and shape change through targeting the RhoA-Rho kinase-MLC phosphatase signaling pathway. *Blood*. 2013;122(20):3533-45.
64. Beck F, Geiger J, Gambaryan S, Veit J, Vaudel M, Nollau P, et al. Time-resolved characterization of cAMP/PKA-dependent signaling reveals that platelet inhibition is a concerted process involving multiple signaling pathways. *Blood*. 2014;123(5):e1-e10.
65. Murugappa S, Kunapuli SP. The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci*. 2006;11:1977-86.
66. Smyth SS, Woulfe DS, Weitz JI, Gachet C, Conley PB, Goodman SG, et al. G-protein-coupled receptors as signaling targets for antiplatelet therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(4):449-57.
67. Bergmeier W, Stefanini L. Platelet ITAM signaling. *Curr Opin Hematol*. 2013;20(5):445-50.
68. Rayes J, Watson SP, Nieswandt B. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2. *J Clin Invest*. 2019;129(1):12-23.
69. Pollitt AY, Grygielska B, Leblond B, Désiré L, Eble JA, Watson SP. Phosphorylation of CLEC-2 is dependent on lipid rafts, actin polymerization, secondary mediators, and Rac. *Blood*. 2010;115(14):2938-46.

70. Holtkötter O, Nieswandt B, Smyth N, Müller W, Hafner M, Schulte V, et al. Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J Biol Chem.* 2002;277(13):10789-94.
71. Estevez B, Shen B, Du X. Targeting integrin and integrin signaling in treating thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(1):24-9.
72. Auger JM, Kuijpers MJ, Senis YA, Watson SP, Heemskerk JW. Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. *FASEB J.* 2005;19(7):825-7.
73. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res.* 2004;114(4):221-33.
74. Nieswandt B, Bergmeier W, Schulte V, Rackebrandt K, Gessner JE, Zirngibl H. Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain. *J Biol Chem.* 2000;275(31):23998-4002.
75. Miura Y, Takahashi T, Jung SM, Moroi M. Analysis of the interaction of platelet collagen receptor glycoprotein VI (GPVI) with collagen. A dimeric form of GPVI, but not the monomeric form, shows affinity to fibrous collagen. *J Biol Chem.* 2002;277(48):46197-204.
76. Jung SM, Moroi M, Soejima K, Nakagaki T, Miura Y, Berndt MC, et al. Constitutive dimerization of glycoprotein VI (GPVI) in resting platelets is essential for binding to collagen and activation in flowing blood. *J Biol Chem.* 2012;287(35):30000-13.

77. Jung SM, Tsuji K, Moroi M. Glycoprotein (GP) VI dimer as a major collagen-binding site of native platelets: direct evidence obtained with dimeric GPVI-specific Fabs. *J Thromb Haemost.* 2009;7(8):1347-55.
78. Poulter NS, Pollitt AY, Owen DM, Gardiner EE, Andrews RK, Shimizu H, et al. Clustering of glycoprotein VI (GPVI) dimers upon adhesion to collagen as a mechanism to regulate GPVI signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2017;15(3):549-64.
79. Knight CG, Morton LF, Onley DJ, Peachey AR, Ichinohe T, Okuma M, et al. Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet Gp VI and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res.* 1999;41(2):450-7.
80. Asselin J, Gibbins JM, Achison M, Lee YH, Morton LF, Farndale RW, et al. A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1. *Blood.* 1997;89(4):1235-42.
81. Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJ, Moroi M, Ruggeri ZM, Kunicki TJ, et al. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood.* 2006;107(4):1405-12.
82. Riba R, Hughes CE, Graham A, Watson SP, Naseem KM. Globular adiponectin induces platelet activation through the collagen receptor GPVI-Fc receptor gamma chain complex. *J Thromb Haemost.* 2008;6(6):1012-20.

83. Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood*. 2015;126(5):683-91.
84. Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, Watson SK, Frampton J, Bender M, et al. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood*. 2015;126(13):1601-8.
85. Onselaer MB, Hardy AT, Wilson C, Sanchez X, Babar AK, Miller JLC, et al. Fibrin and D-dimer bind to monomeric GPVI. *Blood Adv*. 2017;1(19):1495-504.
86. Induruwa I, Moroi M, Bonna A, Malcor JD, Howes JM, Warburton EA, et al. Platelet collagen receptor Glycoprotein VI-dimer recognizes fibrinogen and fibrin through their D-domains, contributing to platelet adhesion and activation during thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2017.
87. Quek LS, Pasquet JM, Hers I, Cornall R, Knight G, Barnes M, et al. Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway. *Blood*. 2000;96(13):4246-53.
88. Hughes CE, Auger JM, McGlade J, Eble JA, Pearce AC, Watson SP. Differential roles for the adapters Gads and LAT in platelet activation by GPVI and CLEC-2. *J Thromb Haemost*. 2008;6(12):2152-9.
89. Gross BS, Lee JR, Clements JL, Turner M, Tybulewicz VL, Findell PR, et al. Tyrosine phosphorylation of SLP-76 is downstream

of Syk following stimulation of the collagen receptor in platelets. *J Biol Chem.* 1999;274(9):5963-71.

90. Pearce AC, Senis YA, Billadeau DD, Turner M, Watson SP, Vigorito E. Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen. *J Biol Chem.* 2004;279(52):53955-62.

91. Andrews RK, Gardiner EE. Basic mechanisms of platelet receptor shedding. *Platelets.* 2017;28(4):319-24.

92. Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost.* 2010;8(7):1456-67.

93. Colonna M, Samaridis J, Angman L. Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2000;30(2):697-704.

94. Suzuki-Inoue K, Fuller GL, García A, Eble JA, Pöhlmann S, Inoue O, et al. A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood.* 2006;107(2):542-9.

95. Senis YA, Tomlinson MG, García A, Dumon S, Heath VL, Herbert J, et al. A comprehensive proteomics and genomics analysis reveals novel transmembrane proteins in human platelets and mouse megakaryocytes including G6b-B, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif protein. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6(3):548-64.

96. Hughes CE, Pollitt AY, Mori J, Eble JA, Tomlinson MG, Hartwig JH, et al. CLEC-2 activates Syk through dimerization. *Blood*. 2010;115(14):2947-55.
97. Retzbach EP, Sheehan SA, Nevel EM, Batra A, Phi T, Nguyen ATP, et al. Podoplanin emerges as a functionally relevant oral cancer biomarker and therapeutic target. *Oral Oncol*. 2018;78:126-36.
98. Izquierdo I, Barrachina MN, Hermida-Nogueira L, Casas V, Morán LA, Lacerenza S, et al. A Comprehensive Tyrosine Phosphoproteomic Analysis Reveals Novel Components of the Platelet CLEC-2 Signaling Cascade. *Thromb Haemost*. 2020;120(2):262-76.
99. Hughes CE, Sinha U, Pandey A, Eble JA, O'Callaghan CA, Watson SP. Critical Role for an acidic amino acid region in platelet signaling by the HemITAM (hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation motif) containing receptor CLEC-2 (C-type lectin receptor-2). *J Biol Chem*. 2013;288(7):5127-35.
100. Manne BK, Badolia R, Dangelmaier C, Eble JA, Ellmeier W, Kahn M, et al. Distinct pathways regulate Syk protein activation downstream of immune tyrosine activation motif (ITAM) and hemITAM receptors in platelets. *J Biol Chem*. 2015;290(18):11557-68.
101. Lau TL, Kim C, Ginsberg MH, Ulmer TS. The structure of the integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO J*. 2009;28(9):1351-61.
102. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(4):288-300.

103. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood*. 2004;104(6):1606-15.
104. Su X, Mi J, Yan J, Flevaris P, Lu Y, Liu H, et al. RGT, a synthetic peptide corresponding to the integrin beta 3 cytoplasmic C-terminal sequence, selectively inhibits outside-in signaling in human platelets by disrupting the interaction of integrin alpha IIb beta 3 with Src kinase. *Blood*. 2008;112(3):592-602.
105. Tranzer JP, Da Prada M, Pletscher A. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Nature*. 1966;212(5070):1574-5.
106. Holmsen H, Weiss HJ. Secretory storage pools in platelets. *Annu Rev Med*. 1979;30:119-34.
107. Siegel A, Lüscher EF. Non-identity of the alpha-granules of human blood platelets with typical lysosomes. *Nature*. 1967;215(5102):745-7.
108. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967;13(3):269-88.
109. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200(4):373-83.
110. Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet JM, Mornet S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost*. 2014;12(5):614-27.

111. Barrachina MN, Calderón-Cruz B, Fernandez-Rocca L, García Á. Application of Extracellular Vesicles Proteomics to Cardiovascular Disease: Guidelines, Data Analysis, and Future Perspectives. *Proteomics*. 2019;19(1-2):e1800247.
112. Lötval J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:26913.
113. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(4):575-81.
114. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 24):5553-65.
115. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-89.
116. George M, Ganesh MR, Sridhar A, Jena A, Rajaram M, Shanmugam E, et al. Evaluation of Endothelial and Platelet Derived Microparticles in Patients with Acute Coronary Syndrome. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(12):OC09-13.

117. Suades R, Padró T, Vilahur G, Badimon L. Circulating and platelet-derived microparticles in human blood enhance thrombosis on atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost.* 2012;108(6):1208-19.
118. Suades R, Padró T, Alonso R, Mata P, Badimon L. High levels of TSP1+/CD142+ platelet-derived microparticles characterise young patients with high cardiovascular risk and subclinical atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2015;114(6):1310-21.
119. Srikanthan S, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. Exosome poly-ubiquitin inhibits platelet activation, downregulates CD36 and inhibits pro-atherothrombotic cellular functions. *J Thromb Haemost.* 2014;12(11):1906-17.
120. Anfossi G, Russo I, Trovati M. Platelet dysfunction in central obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009;19(6):440-9.
121. Santilli F, Vazzana N, Liani R, Guagnano MT, Davì G. Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev.* 2012;13(1):27-42.
122. Badimon L, Hernández Vera R, Padró T, Vilahur G. Antithrombotic therapy in obesity. *Thromb Haemost.* 2013;110(4):681-8.
123. Leite NR, Siqueira de Medeiros M, Mury WV, Matsuura C, Perszel MB, Noronha Filho G, et al. Platelet hyperaggregability in obesity: is there a role for nitric oxide impairment and oxidative stress? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016;43(8):738-44.

124. Barrachina MN, Sueiro AM, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, Guitián E, Casanueva FF, et al. GPVI surface expression and signalling pathway activation are increased in platelets from obese patients: Elucidating potential anti-atherothrombotic targets in obesity. *Atherosclerosis*. 2019;281:62-70.
125. Jagroop IA, Tsiara S, Mikhailidis DP. Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues. *Platelets*. 2003;14(5):335-6.
126. Hekimsoy Z, Payzin B, Ornek T, Kandoğan G. Mean platelet volume in Type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications*. 2004;18(3):173-6.
127. Greisenegger S, Endler G, Hsieh K, Tentschert S, Mannhalter C, Lalouschek W. Is elevated mean platelet volume associated with a worse outcome in patients with acute ischemic cerebrovascular events? *Stroke*. 2004;35(7):1688-91.
128. Nadar SK, Blann AD, Kamath S, Beevers DG, Lip GY. Platelet indexes in relation to target organ damage in high-risk hypertensive patients: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(2):415-22.
129. Furman-Niedziejko A, Rostoff P, Rychlak R, Golinska-Grzybala K, Wilczynska-Golonka M, Golonka M, et al. Relationship between abdominal obesity, platelet blood count and mean platelet volume in patients with metabolic syndrome. *Folia Med Cracov*. 2014;54(2):55-64.

130. Coban E, Ozdogan M, Yazicioglu G, Akcıt F. The mean platelet volume in patients with obesity. *Int J Clin Pract.* 2005;59(8):981-2.
131. Montilla M, Santi MJ, Carrozas MA, Ruiz FA. Biomarkers of the prothrombotic state in abdominal obesity. *Nutr Hosp.* 2014;31(3):1059-66.
132. Toplak H, Wascher TC. Influence of weight reduction on platelet volume: different effects of a hypocaloric diet and a very low calorie diet. *Eur J Clin Invest.* 1994;24(11):778-80.
133. Ranucci M, Aloisio T, Dedda UD, La Rovere MT, De Arroyabe BML, Baryshnikova E. Platelet reactivity in overweight and obese patients undergoing cardiac surgery. *Platelets.* 2019;30(5):608-14.
134. Panova-Noeva M, Schulz A, Hermanns MI, Grossmann V, Pefani E, Spronk HM, et al. Sex-specific differences in genetic and nongenetic determinants of mean platelet volume: results from the Gutenberg Health Study. *Blood.* 2016;127(2):251-9.
135. Han S, Gan D, Wang G, Ru Y, Huang C, Lin J, et al. Associations of Platelet Indices with Body Fat Mass and Fat Distribution. *Obesity (Silver Spring).* 2018;26(10):1637-43.
136. Raoux L, Moszkowicz D, Vychnevskaya K, Poghosyan T, Beauchet A, Clauser S, et al. Effect of Bariatric Surgery-Induced Weight Loss on Platelet Count and Mean Platelet Volume: a 12-Month Follow-Up Study. *Obes Surg.* 2017;27(2):387-93.

137. Johansson HE, Wåhlén A, Aldenbäck E, Haenni A. Platelet Counts and Liver Enzymes After Gastric Bypass Surgery. *Obes Surg*. 2018;28(6):1526-31.
138. De Pergola G, Pannacciulli N, Coviello M, Scarangella A, Di Roma P, Caringella M, et al. sP-selectin plasma levels in obesity: association with insulin resistance and related metabolic and prothrombotic factors. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008;18(3):227-32.
139. Ustyol A, Ayçan Ustyol E, Gurdol F, Kokali F, Bekpınar S. P-selectin, endocan, and some adhesion molecules in obese children and adolescents with non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017;77(3):205-9.
140. Csongrádi É, Nagy B, Fulop T, Varga Z, Karányi Z, Magyar MT, et al. Increased levels of platelet activation markers are positively associated with carotid wall thickness and other atherosclerotic risk factors in obese patients. *Thromb Haemost*. 2011;106(4):683-92.
141. Unek IT, Bayraktar F, Solmaz D, Ellidokuz H, Sisman AR, Yuksel F, et al. The levels of soluble CD40 ligand and C-reactive protein in normal weight, overweight and obese people. *Clin Med Res*. 2010;8(2):89-95.
142. Baena-Fustegueras JA, Pardina E, Balada E, Ferrer R, Catalán R, Rivero J, et al. Soluble CD40 ligand in morbidly obese patients: effect of body mass index on recovery to normal levels after gastric bypass surgery. *JAMA Surg*. 2013;148(2):151-6.

143. Heffron SP, Marier C, Parikh M, Fisher EA, Berger JS. Severe obesity and bariatric surgery alter the platelet mRNA profile. *Platelets*. 2018;1-8.
144. Bordeaux BC, Qayyum R, Yanek LR, Vaidya D, Becker LC, Faraday N, et al. Effect of obesity on platelet reactivity and response to low-dose aspirin. *Prev Cardiol*. 2010;13(2):56-62.
145. Dallak M, Bin-Jaliah I, Sakr HF, Al-Ani B, Haidara MA. Swim exercise inhibits hemostatic abnormalities in a rat model of obesity and insulin resistance. *Arch Physiol Biochem*. 2019;125(1):79-84.
146. Kreutz RP, Alloosh M, Mansour K, Neeb Z, Kreutz Y, Flockhart DA, et al. Morbid obesity and metabolic syndrome in Ossabaw miniature swine are associated with increased platelet reactivity. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2011;4:99-105.
147. Elaïb Z, Lopez JJ, Coupaye M, Zuber K, Becker Y, Kondratieff A, et al. Platelet Functions are Decreased in Obesity and Restored after Weight Loss: Evidence for a Role of the SERCA3-Dependent ADP Secretion Pathway. *Thromb Haemost*. 2019;119(3):384-96.
148. Raffaelli F, Nanetti L, D'Angelo M, Montecchiani G, Alidori A, Montesi L, et al. Interactions between lipoproteins and platelet membranes in obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(7):1375-80.
149. Elmas B, Karacan M, Dervişoğlu P, Kösecik M, İşgüven Ş, Bal C. Dynamic thiol/disulphide homeostasis as a novel indicator of oxidative stress in obese children and its relationship with

inflammatory-cardiovascular markers. *Anatol J Cardiol.* 2017;18(5):361-9.

150. Colas R, Sassolas A, Guichardant M, Cugnet-Anceau C, Moret M, Moulin P, et al. LDL from obese patients with the metabolic syndrome show increased lipid peroxidation and activate platelets. *Diabetologia.* 2011;54(11):2931-40.

151. Gaspar RS, Trostchansky A, Paes AM. Potential Role of Protein Disulfide Isomerase in Metabolic Syndrome-Derived Platelet Hyperactivity. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:2423547.

152. Gegenbauer K, Elia G, Blanco-Fernandez A, Smolenski A. Regulator of G-protein signaling 18 integrates activating and inhibitory signaling in platelets. *Blood.* 2012;119(16):3799-807.

153. Russo I, Traversa M, Bonomo K, De Salve A, Mattiello L, Del Mese P, et al. In central obesity, weight loss restores platelet sensitivity to nitric oxide and prostacyclin. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(4):788-97.

154. Anfossi G, Russo I, Massucco P, Mattiello L, Doronzo G, De Salve A, et al. Impaired synthesis and action of antiaggregating cyclic nucleotides in platelets from obese subjects: possible role in platelet hyperactivation in obesity. *Eur J Clin Invest.* 2004;34(7):482-9.

155. Eguchi A, Lazic M, Armando AM, Phillips SA, Katebian R, Maraka S, et al. Circulating adipocyte-derived extracellular vesicles are novel markers of metabolic stress. *J Mol Med (Berl).* 2016;94(11):1241-53.

156. Pardo F, Villalobos-Labra R, Sobrevia B, Toledo F, Sobrevia L. Extracellular vesicles in obesity and diabetes mellitus. *Mol Aspects Med.* 2018;60:81-91.
157. Murakami T, Horigome H, Tanaka K, Nakata Y, Ohkawara K, Katayama Y, et al. Impact of weight reduction on production of platelet-derived microparticles and fibrinolytic parameters in obesity. *Thromb Res.* 2007;119(1):45-53.
158. Phoonsawat W, Aoki-Yoshida A, Tsuruta T, Sonoyama K. Adiponectin is partially associated with exosomes in mouse serum. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;448(3):261-6.
159. Santamaria-Martos F, Benitez ID, Latorre J, Lluch A, Moreno-Navarrete JM, Sabater M, et al. Comparative and functional analysis of plasma membrane-derived extracellular vesicles from obese vs. nonobese women. *Clin Nutr.* 2019.
160. Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Barrera Ramírez C, Sabaté M, Fernandez C, et al. Platelet aggregation according to body mass index in patients undergoing coronary stenting: should clopidogrel loading-dose be weight adjusted? *J Invasive Cardiol.* 2004;16(4):169-74.
161. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Sabaté M, Hernández-Antolín R, et al. Is a 300 mg clopidogrel loading dose sufficient to inhibit platelet function early after coronary stenting? A platelet function profile study. *J Invasive Cardiol.* 2004;16(6):325-9.

162. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, Koppensteiner R, Panzer S, Kopp CW. Obesity is associated with poor response to clopidogrel and an increased susceptibility to protease activated receptor-1 mediated platelet activation. *Transl Res.* 2013;161(5):421-9.
163. Zaccardi F, Pitocco D, Willeit P, Laukkanen JA. Efficacy and safety of P2Y₁₂ inhibitors according to diabetes, age, gender, body mass index and body weight: systematic review and meta-analyses of randomized clinical trials. *Atherosclerosis.* 2015;240(2):439-45.
164. Doğan A, Kahraman S, Usta E, Özdemir E, Görmüş U, Çiftçi C. Effect of obesity and serum leptin level on clopidogrel resistance. *Türk Kardiyol Dern Ars.* 2016;44(7):548-53.
165. Darlington A, Tello-Montoliu A, Rollini F, Ueno M, Ferreira JL, Patel R, et al. Pharmacodynamic effects of standard dose prasugrel versus high dose clopidogrel in non-diabetic obese patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2014;111(2):258-65.
166. García A. Two-dimensional gel electrophoresis in platelet proteomics research. *Methods Mol Med.* 2007;139:339-53.
167. Vila-Liante V, Sánchez-López V, Martínez-Sales V, Ramón-Núñez LA, Arellano-Orden E, Cano-Ruiz A, et al. Impact of sample processing on the measurement of circulating microparticles: storage and centrifugation parameters. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(11):1759-67.
168. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of

circulating microparticles: towards standardization of protocol. *J Thromb Haemost.* 2012;10(3):437-46.

169. Barrachina MN, Sueiro AM, Casas V, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, Guitián E, et al. A Combination of Proteomic Approaches Identifies A Panel of Circulating Extracellular Vesicle Proteins Related to the Risk of Suffering Cardiovascular Disease in Obese Patients. *Proteomics.* 2019;19(1-2):e1800248.

170. Ramacciotti E, Hawley AE, Wroblewski SK, Myers DD, Strahler JR, Andrews PC, et al. Proteomics of microparticles after deep venous thrombosis. *Thromb Res.* 2010;125(6):e269-74.

171. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost.* 2009;7(1):190-7.

172. Cointe S, Judicone C, Robert S, Mooberry MJ, Poncelet P, Wauben M, et al. Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. *J Thromb Haemost.* 2017;15(1):187-93.

173. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14440-5.

174. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009;6(5):359-62.
175. MacLean BX, Pratt BS, Egertson JD, MacCoss MJ, Smith RD, Baker ES. Using Skyline to Analyze Data-Containing Liquid Chromatography, Ion Mobility Spectrometry, and Mass Spectrometry Dimensions. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2018;29(11):2182-8.
176. Kim DK, Kang B, Kim OY, Choi DS, Lee J, Kim SR, et al. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2013;2.
177. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D512-20.
178. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):e1001450.
179. Boyanova D, Nilla S, Birschmann I, Dandekar T, Dittrich M. PlateletWeb: a systems biologic analysis of signaling networks in human platelets. *Blood*. 2012;119(3):e22-34.
180. Pathan M, Keerthikumar S, Chisanga D, Alessandro R, Ang CS, Askenase P, et al. A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1):1321455.

181. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-504.
182. Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, et al. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D412-6.
183. Al-Tamimi M, Mu FT, Moroi M, Gardiner EE, Berndt MC, Andrews RK. Measuring soluble platelet glycoprotein VI in human plasma by ELISA. *Platelets.* 2009;20(3):143-9.
184. BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8):911-7.
185. Barrans A, Collet X, Barbaras R, Jaspard B, Manent J, Vieu C, et al. Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J Biol Chem.* 1994;269(15):11572-7.
186. Aurbach K, Spindler M, Haining EJ, Bender M, Pleines I. Blood collection, platelet isolation and measurement of platelet count and size in mice-a practical guide. *Platelets.* 2019;30(6):698-707.
187. García A, Prabhakar S, Brock CJ, Pearce AC, Dwek RA, Watson SP, et al. Extensive analysis of the human platelet proteome by

two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2004;4(3):656-68.

188. Vélez P, Ocaranza-Sánchez R, López-Otero D, Grigorian-Shamagian L, Rosa I, Guitián E, et al. Alteration of platelet GPVI signaling in ST-elevation myocardial infarction patients demonstrated by a combination of proteomic, biochemical, and functional approaches. *Sci Rep*. 2016;6:39603.

189. Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, et al. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D649-D55.

190. García-Rubio D, Rodríguez-Varela M, Martínez-Vieyra I, de la Mora MB, Méndez-Méndez JV, Durán-Álvarez JC, et al. Alterations to the contents of plasma membrane structural lipids are associated with structural changes and compartmentalization in platelets in hypertension. *Exp Cell Res*. 2019;385(2):111692.

191. Muller S, Ziegler O, Donner M, Drouin P, Stoltz JF. Rheological properties and membrane fluidity of red blood cells and platelets in primary hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*. 1990;83(2-3):231-7.

192. Giles ED, Jackman MR, MacLean PS. Modeling Diet-Induced Obesity with Obesity-Prone Rats: Implications for Studies in Females. *Front Nutr*. 2016;3:50.

193. BARBORIAK JJ, KREHL WA, COWGILL GR, WHEDON AD. Influence of high-fat diets on growth and development of obesity in the albino rat. *J Nutr.* 1958;64(2):241-9.
194. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17(1):4-12.
195. Monteiro PF, Morganti RP, Delbin MA, Calixto MC, Lopes-Pires ME, Marcondes S, et al. Platelet hyperaggregability in high-fat fed rats: a role for intraplatelet reactive-oxygen species production. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:5.
196. Alhawiti NM. Antiplatelets and profibrinolytic activity of *Citrullus colocynthis* in control and high-fat diet-induced obese rats: mechanisms of action. *Arch Physiol Biochem.* 2018;124(2):156-66.
197. Grill A, Kiouptsi K, Karwot C, Jurk K, Reinhardt C. Evaluation of blood collection methods and anticoagulants for platelet function analyses on C57BL/6J laboratory mice. *Platelets.* 2019:1-8.
198. García A, Zitzmann N, Watson SP. Analyzing the platelet proteome. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(4):485-9.
199. Tzotzas T, Evangelou P, Kiortsis DN. Obesity, weight loss and conditional cardiovascular risk factors. *Obes Rev.* 2011;12(5):e282-9.
200. Blanchong CA, Chung EK, Rupert KL, Yang Y, Yang Z, Zhou B, et al. Genetic, structural and functional diversities of human

complement components C4A and C4B and their mouse homologues, Slp and C4. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(3):365-92.

201. Petrucci G, Zaccardi F, Giaretta A, Cavalca V, Capristo E, Cardillo C, et al. Obesity is associated with impaired responsiveness to once-daily low-dose aspirin and in vivo platelet activation. *J Thromb Haemost*. 2019;17(6):885-95.

202. Abdel-Moneim A, Mahmoud B, Sultan EA, Mahmoud R. Relationship of leukocytes, platelet indices and adipocytokines in metabolic syndrome patients. *Diabetes Metab Syndr*. 2019;13(1):874-80.

203. García A, Watson SP, Dwek RA, Zitzmann N. Applying proteomics technology to platelet research. *Mass Spectrom Rev*. 2005;24(6):918-30.

204. Arentz G, Weiland F, Oehler MK, Hoffmann P. State of the art of 2D DIGE. *Proteomics Clin Appl*. 2015;9(3-4):277-88.

205. Kong P, Cavalera M, Frangogiannis NG. The role of thrombospondin (TSP)-1 in obesity and diabetes. *Adipocyte*. 2014;3(1):81-4.

206. Matsuo Y, Tanaka M, Yamakage H, Sasaki Y, Muranaka K, Hata H, et al. Thrombospondin 1 as a novel biological marker of obesity and metabolic syndrome. *Metabolism*. 2015;64(11):1490-9.

207. Mosesson MW. Fibrinogen gamma chain functions. *J Thromb Haemost*. 2003;1(2):231-8.

208. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1894-904.
209. Lovely R, Hossain J, Ramsey JP, Komakula V, George D, Farrell DH, et al. Obesity-related increased γ' fibrinogen concentration in children and its reduction by a physical activity-based lifestyle intervention: a randomized controlled study. *J Pediatr.* 2013;163(2):333-8.
210. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation.* 2003;107(3):499-511.
211. Nagy B, Bhavaraju K, Getz T, Bynagari YS, Kim S, Kunapuli SP. Impaired activation of platelets lacking protein kinase C- θ isoform. *Blood.* 2009;113(11):2557-67.
212. Pula G, Crosby D, Baker J, Poole AW. Functional interaction of protein kinase Calpha with the tyrosine kinases Syk and Src in human platelets. *J Biol Chem.* 2005;280(8):7194-205.
213. Al-Tamimi M, Gardiner EE, Thom JY, Shen Y, Cooper MN, Hankey GJ, et al. Soluble glycoprotein VI is raised in the plasma of patients with acute ischemic stroke. *Stroke.* 2011;42(2):498-500.
214. Bigalke B, Stellos K, Weig HJ, Geisler T, Seizer P, Kremmer E, et al. Regulation of platelet glycoprotein VI (GPVI) surface

expression and of soluble GPVI in patients with atrial fibrillation (AF) and acute coronary syndrome (ACS). *Basic Res Cardiol.* 2009;104(3):352-7.

215. O'Donnell VB, Murphy RC, Watson SP. Platelet lipidomics: modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets. *Circ Res.* 2014;114(7):1185-203.

216. Stephenson DJ, Hoeflerlin LA, Chalfant CE. Lipidomics in translational research and the clinical significance of lipid-based biomarkers. *Transl Res.* 2017;189:13-29.

217. Dash D, Rao GR, Somani PN, Das BK, Dube B. Physical microenvironment of platelet membrane in acute myocardial infarction. *Indian J Biochem Biophys.* 1990;27(4):264-7.

218. Watala C, Boncer M, Golański J, Koziolkiewicz W, Trojanowski Z, Walkowiak B. Platelet membrane lipid fluidity and intraplatelet calcium mobilization in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Haematol.* 1998;61(5):319-26.

219. Marcus AJ, Ullman HL, Safier LB. Lipid composition of subcellular particles of human blood platelets. *J Lipid Res.* 1969;10(1):108-14.

220. Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 2004;5(8):777-82.

221. Wang CT, Schick PK. The effect of thrombin on the organization of human platelet membrane glycosphingolipids. The

sphingosine composition of platelet glycolipids and ceramides. *J Biol Chem.* 1981;256(2):752-6.

222. Dahm F, Nocito A, Bielawska A, Lang KS, Georgiev P, Asmis LM, et al. Distribution and dynamic changes of sphingolipids in blood in response to platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2006;4(12):2704-9.

223. Mujalli A, Chicanne G, Bertrand-Michel J, Viars F, Stephens L, Hawkins P, et al. Profiling of phosphoinositide molecular species in human and mouse platelets identifies new species increasing following stimulation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018;1863(9):1121-31.

224. Zucker LM. Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1965;131(1):447-58.

225. O'Rahilly S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature.* 2009;462(7271):307-14.

226. Lutz TA. Considering our methods: Methodological issues with rodent models of appetite and obesity research. *Physiol Behav.* 2018;192:182-7.

227. Duarte FO, Sene-Fiorese M, Manzoni MS, de Freitas LF, Cheik NC, Garcia de Oliveira Duarte AC, et al. Caloric restriction and refeeding promoted different metabolic effects in fat depots and impaired dyslipidemic profile in rats. *Nutrition.* 2008;24(2):177-86.

228. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007;41(1):111-9.
229. Jirouskova M, Shet AS, Johnson GJ. A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations. *J Thromb Haemost*. 2007;5(4):661-9.
230. Pedersen OH, Nissen PH, Hvas AM. Platelet function investigation by flow cytometry: Sample volume, needle size, and reference intervals. *Platelets*. 2018;29(2):199-202.
231. Pasquet JM, Gross B, Quek L, Asazuma N, Zhang W, Sommers CL, et al. LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol Cell Biol*. 1999;19(12):8326-34.
232. Mathers RA, Evans, G.O. & Bleby, J. Platelet measurements in rat, dog and mouse blood samples using the Sysmex XT-2000iV. *Comp Clin Pathol* 2013.
233. Hernández Vera R, Vilahur G, Badimon L. Obesity with insulin resistance increase thrombosis in wild-type and bone marrow-transplanted Zucker Fatty rats. *Thromb Haemost*. 2013;109(2):319-27.
234. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(3):301-12.

235. Rotilio D, Della Corte A, D'Imperio M, Coletta W, Marcone S, Silvestri C, et al. Proteomics: bases for protein complexity understanding. *Thromb Res.* 2012;129(3):257-62.
236. Copenhaver M, Yu CY, Hoffman RP. Complement Components, C3 and C4, and the Metabolic Syndrome. *Curr Diabetes Rev.* 2018.
237. Al Haj Ahmad RM, Al-Domi HA. Complement 3 serum levels as a pro-inflammatory biomarker for insulin resistance in obesity. *Diabetes Metab Syndr.* 2017;11 Suppl 1:S229-S32.
238. Hertle E, van Greevenbroek MM, Stehouwer CD. Complement C3: an emerging risk factor in cardiometabolic disease. *Diabetologia.* 2012;55(4):881-4.
239. Hertle E, Stehouwer CD, van Greevenbroek MM. The complement system in human cardiometabolic disease. *Mol Immunol.* 2014;61(2):135-48.
240. Onat A, Can G, Rezvani R, Cianflone K. Complement C3 and cleavage products in cardiometabolic risk. *Clin Chim Acta.* 2011;412(13-14):1171-9.
241. Hernández-Mijares A, Bañuls C, Bellod L, Jover A, Solá E, Morillas C, et al. Effect of weight loss on C3 and C4 components of complement in obese patients. *Eur J Clin Invest.* 2012;42(5):503-9.
242. Nilsson B, Hamad OA, Ahlström H, Kullberg J, Johansson L, Lindhagen L, et al. C3 and C4 are strongly related to adipose tissue

variables and cardiovascular risk factors. *Eur J Clin Invest.* 2014;44(6):587-96.

243. Ghadge AA, Khaire AA, Kuvalekar AA. Adiponectin: A potential therapeutic target for metabolic syndrome. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018;39:151-8.

244. Palikhe A, Sinisalo J, Seppänen M, Haario H, Meri S, Valtonen V, et al. Serum complement C3/C4 ratio, a novel marker for recurrent cardiovascular events. *Am J Cardiol.* 2007;99(7):890-5.

245. Vélez P, Parguina AF, Ocaranza-Sánchez R, Grigorian-Shamagian L, Rosa I, Alonso-Orgaz S, et al. Identification of a circulating microvesicle protein network involved in ST-elevation myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2014;112(4):716-26.

246. Alexander KS, Madden TE, Farrell DH. Association between γ' fibrinogen levels and inflammation. *Thromb Haemost.* 2011;105(4):605-9.

247. Zhang X, McGeoch SC, Johnstone AM, Holtrop G, Sneddon AA, MacRury SM, et al. Platelet-derived microparticle count and surface molecule expression differ between subjects with and without type 2 diabetes, independently of obesity status. *J Thromb Thrombolysis.* 2014;37(4):455-63.

248. Karkeni E, Astier J, Tourniaire F, El Abed M, Romier B, Gouranton E, et al. Obesity-associated Inflammation Induces microRNA-155 Expression in Adipocytes and Adipose Tissue:

Outcome on Adipocyte Function. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101(4):1615-26.





8. ANEXOS



ANEXO I. LISTA MATERIAL, EQUIPOS Y REACTIVOS UTILIZADO EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

ANEXO II - Lista del material utilizado en la presente tesis doctoral.

Material	Referencia	Casa Comercial
Tubos de coagulación	Vacurette® 454329	Greiner group
Cubetas agregómetro	312	Chrono-Log
Cubetas espectrofotómetro	634-0676	VWR
Navecillas de pesaje	611-9182 611-1996	VWR
Placas de pocillos	Nunc MaxiSorp™ 442404	Invitrogen (ThermoFisher)
Tubos ultracentrífuga	Ultra-Clear™ 344057	Beckman Coulter
Geles poliacrilamida 4-12%	Novex® NP0321	Invitrogen (ThermoFisher)
Cassettes vacíos para geles	Novex® NC2010	Invitrogen (ThermoFisher)
Membranas PVDF	Immobilon™ IPVH00010	Merck
Papel de filtro transferencia	Amersham™ Hybond® RPN6101M	GE Healthcare
Películas revelado	Amersham™ Hybond® 906835	GE Healthcare
Filtros 10 kDa para FASP/LFASP	Amicon™ UFC501096 / UFC900396	Millipore
Puntas para desalado	TopTip™ TT10C18	PolyLC
Hoja de bisturí	Nº15	Jai Surgicals
Microtubos	0030120086 0030120094 0030121112 0030119401 0030108116	Eppendorf
Puntas de pipeta	Ep T.I.P.S.® 0030000919	Eppendorf

	53509-015	VWR
	Axygen® 301-03-051 Axygen® 301-02-301	Corning
Tubos de centrifuga	525-0400 525-0402	VWR

ANEXO I.II - Lista de equipos utilizados en la presente tesis doctoral.

Equipo	Modelo	Casa Comercial
Centrífuga hematológica	Eppendorf 5702	Eppendorf
Centrífugas de microtubos	Eppendorf 5415 R	Eppendorf
	Eppendorf 5430 R	Eppendorf
	Eppendorf miniSpin Plus	Eppendorf
Centrífuga de tubos y placas	Beckman Allegra 25R	Beckman Coulter
	Rotor TS-5.1-500	Beckman Coulter
Contador de partículas	Z1 Coulter Particle Counter	Beckman Coulter
Agregómetro	Chrono-Log 490-X	Chrono-Log
Citómetro	BD Accuri C6	Becton Dickinson
	FACSCalibur	Becton Dickinson
Lector de placas	Infinite M1000	Tecan
Ultracentrífuga	Beckman XL-100K	Beckman Coulter
	Rotor SW 55 Ti	Beckman Coulter
Sonicador	Branson Sonifier® S-150D	Emerson Electric
Espectrofotómetro	Genesys 20	Thermo Scientific
Medidor de pH	pHenomenal™ pH 1100L	VWR
Agitador magnético	VMS-A	VWR

Balanza de precisión	Acculab Atilon	Sartorius Stedim Biotech
Balanza analítica	Sartorius LE244S	Sartorius Stedim Biotech
Termobloque	Digital Heatblock	VWR
Agitador orbital	Heidolph Rotamax 120	Heidolph
Cubeta de electroforesis	XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen
Módulo de transferencia	XCell IITM Blot Module	Invitrogen
Sistema de imagen de geles	Gel Doc XR + filtro 630BP30 62nm	Bio-Rad Laboratories
	Typhoon FLA 7000	GE Healthcare
Transiluminador	Dark Reader® DR45M	Clare Chemical
SpeedVac	Savant™ SPD121P SpeedVac	Thermo Scientific
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer® comfort	Eppendorf
Liofilizador	CRYODOS	Telstar Life Sciences
Microscopio	JEOL JEM-1011	JEOL, Inc.
Contaje de subpartículas	NanoSight NS300	Malvern Panalytical
Sistemas de HPLC	Agilent 1200	Agilent Technologies
	Easy nLC	Proxeon
Espectrómetros de masas	MALDI-TOF/TOF	Applied Biosystems
	LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific
	Amazon ETD ion trap	Bruker

ANEXO I.III - Lista de reactivos utilizados en la presente tesis doctoral

Reactivo	Referencia	Casa Comercial
β-mercaptoetanol	M6250	Sigma
Acetona	BDH1101	VWR Chemicals

Acetonitrilo	34998	Sigma
Ácido acético	BDH3098-3.8LP	VWR Chemicals
Ácido araquidónico	10006607	Cayman Chemical Company
Ácido cítrico monohidrato	1.002.441.000	Merck
Ácido clorhídrico	100317	Merck
Ácido tricloroacético	20742.180	Amresco® (VWR)
Ácido fórmico	F0507	Sigma
Ácido trifluoroacético	302031	Sigma
ADP	A2754	Sigma
AEBSF	101500	Millipore
Albúmina de huevo	A5503	Sigma
Apirasa	A6535	Sigma
Aprotinina	A1153	Sigma
Azida de sodio	S8032	Sigma
Azul bromofenol	114391	Sigma
Benzamidina	616	Amresco® (VWR)
Bicarbonato de sodio	S5761	Sigma
Bromuro potásico	26.708.238	AnalaR NORMAPUR (VWR)
CHAPS	C9426	Sigma
BSA	A4503	Sigma
Citrato sódico	S1804	Sigma
Cloruro cálcico	449709	Sigma
Cloruro de magnesio	M8266	Sigma
Cloruro potásico	P9541	Sigma
Cloruro sódico	Electran® 443824T	VWR Chemicals

Colágeno	Kollagenreagens Horm®	Takeda
Coomassie Plus	23238	Thermo Scientific
CRP-XL	-	University of Cambridge
D-(+)-Glucosa	G8270	Sigma
DMP	21666	Thermo Scientific
Dodecilsulfato sódico	97064-470	VWR
Dodecilsulfato sódico - Solución 2%	71736	Sigma
DTT	10197777001	Roche
EDTA	E5134	Sigma
EGTA	E0396	Sigma
Eptifibatida	Integrilin®	GlaxoSmithKline
Fluoruro de sodio	S7920	Sigma
Glicerol	M152	Amresco® (VWR)
Glicina	M103	Amresco® (VWR)
HEPES	441476L	VWR
Hidróxido sódico	288.244.262	AnalaR NORMAPUR (VWR)
Indometacina	I7378	Sigma
Inhibidores de proteasas	M250	Amresco® (VWR)
Isoton® II	8546719	Beckman Coulter
Kit micro BCA™	23235	Thermo Scientific
Leupeptina	J61188	Alfa Aesar
Líquido de fijación	G 354	Agfa
Líquido de revelado	G 150	Agfa
Marcador de peso molecular	26616	Thermo Scientific
Metanol	BDH1135	VWR Chemicals

MOPS 20X - Tampón de electroforesis	NP0001	Invitrogen (ThermoFisher)
N-dodecil-β-D-maltósido	J424	Amresco® (VWR)
Ortovanadato de sodio	S6508	Sigma
Pepstatina	77170	Sigma
Persulfato de amonio	A3678	Sigma
PNPP	20-106	Sigma
Prostaglandina I ₂ (PGI ₂)	18220	Cayman Chemical
<i>Rhodocytin</i>	-	Universität Münster
SDS	L3771	Sigma
Solución Acrilamida-Bis	10688.01	Serva
Sucrosa	84097	Sigma
Sustrato ECL	Pierce™ 32106	Thermo Scientific
SYPRO® Ruby	50562	Lonza
Tiourea	VWRVM226	VWR
Tripsina	V511A	Promega
Tris base	497	Amresco® (VWR)
Trombina	605190	Merck
Tween® 20	M147	Amresco® (VWR)
Urea	VWRVM123	VWR
Yodoacetamida	I1149	Sigma

ANEXO II. COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES Y TAMPONES EMPLEADOS EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

- ACD: Ácido cítrico - 78 mM Citrato tri-sódico - 96,6 mM • Glucosa - 111 mM.
- MTB Cloruro sódico - 134 mM; Fosfato disódico - 0,34 mM ; Cloruro potásico - 2,9 mM ; Bicarbonato sódico - 12 mM ; HEPES - 20 mM ; Cloruro de magnesio - 1 mM; pH 7,3.
- Tampón de lisis NP-40 2X: Cloruro sódico - 0,3 M; Tris BASE - 20 mM; EGTA - 2 mM; EDTA - 2 mM; NP-40 - 2% (v/v). Inhibidores de proteasas: Aprotinina - 10 µg/ml, Pepstatina - 1 µg/ml, Leupeptina - 10 µg/ml, AEBSF - 400 µg/ml, Ortovanadato sódico - 5 mM, pH 7,5.
- PBS: Cloruro sódico - 137 mM, Cloruro potásico - 2,7 mM • Fosfato disódico - 8,1 mM, Fosfato potásico monobásico - 1,76 mM.
- Solución sustrato para adhesión: PNPP - 3,8 mM • Triton X-100 - 0,1% (v/v), Tampón citrato 0,1 M pH 5,4: Citrato sódico - 0,0819 M, Ácido cítrico - 0,0181 M.
- Tampón SDS: SDS - 2% (p/v), Tris pH 7,6 - 500 mM, DTT - 0,05 M.
- Tampón Laemmli 5X: Tris pH 6,8 - 0,125 M, SDS - 10% (p/v), Glicerol - 50% (v/v), β-mercaptoetanol - 25% (v/v), Azul de bromofenol - 0,02% (v/v)

- Tampón TBS-T: Tris pH 7,6 - 0,02 M, Cloruro sódico - 0,137 M, Tween 20 - 1% (v/v), pH 7,6.
- Tampón de cuantificación: Urea - 5 M, Tiourea - 2 M, CHAPS - 65 mM, NDSB-256 - 150 mM, Inhibidores de fosfatasas: Ortovanadato de sodio - 1 mM, Fluoruro de sodio - 0,1 mM, Benzamidina - 1 mM.
- Tampón de electroforesis: Tris base - 0,25 M, Glicina - 1,92 M, SDS - 1% (p/v).
- Solución de fijación: Metanol - 10% (v/v), Ácido acético - 7% (v/v).
- Tampón de transferencia: Tris BASE - 0,025 M, Glicina - 0,191 M, Metanol - 20% (v/v).
- Solución de bloqueo inmunodetección: BSA - 5% (p/v), Azida sódica - 0,1% (p/v) - TBS-T c.s.p.
- Tampón UA: Urea - 8 M, Tris pH 8,5 - 0,1 M.
- Tampón IAP: MOPS pH 7,2 - 50 mM, Fosfato disódico - 10 mM, Cloruro sódico - 50 mM.

ANEXO III. HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Titulo del estudio: **Identificación de biomarcadores plaquetarios en enfermedades cardiovasculares mediante proteómica clínica**

Investigador Principal: Angel García Alonso

Centros: CH Universitario de Santiago y Universidade de Santiago de Compostela

Introducción:

Las enfermedades trombóticas y cardiovasculares son hoy en día la principal causa de muerte en Galicia. Las proteínas celulares y plasmáticas involucradas en la formación de trombos influyen en la estructura / función del coágulo y en la respuesta del paciente a las terapias antitrombóticas. Entre los componentes celulares fundamentales de un coágulo / trombo, destacan las plaquetas. Desde un punto de vista patológico, una excesiva activación plaquetaria está asociada con las enfermedades trombóticas y cardiovasculares, para las cuales la obesidad es un factor de riesgo. Una investigación en detalle de aquellas proteínas responsables de una activación no deseada de las plaquetas, así como de la baja respuesta de un paciente a los fármacos antiagregantes plaquetarios, contribuiría a la identificación de nuevos biomarcadores y objetivos terapéuticos que ayuden a un mejor diagnóstico / tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

Objetivos del estudio:

1. El principal objetivo de este estudio es conseguir la identificación de biomarcadores y dianas terapéuticas en enfermedades cardiovasculares mediante proteómica (estudio detallado de las proteínas), centrándose en el estudio de las plaquetas de pacientes con síndrome coronario agudo (SCA), donde una activación plaquetaria anormal juega un papel fundamental.

2. Se comparará el proteoma de plaquetas de pacientes con SCA, con el de individuos sanos, y con cardiopatía isquémica crónica estable (controles). Los controles incluirán individuos delgados y obesos. Se estudiarán además las proteínas secretadas por las plaquetas y que son liberadas al plasma. Se procederá así mismo a la posterior validación funcional – mediante técnicas de bioquímica y biología molecular – de todas aquellas proteínas de interés identificadas, y se harán estudios de agregación plaquetaria. Los datos obtenidos se correlacionarán con la evolución clínica de los pacientes.

3. Se identificará mediante agregación plaquetaria a los individuos con SCA que tengan baja repuesta al tratamiento antiplaquetario y se realizará un estudio proteómico para identificar biomarcadores y vías de activación plaquetaria que influyan en la baja respuesta al medicamento.

Esta nueva investigación está enfocada hacia una mejora en el diagnóstico / tratamiento de la enfermedad cardiovascular y su relación con la obesidad y la baja respuesta a los antiagregantes plaquetarios.

Obtención de las muestras.

En el momento del ingreso, o en las horas inmediatamente posteriores al mismo, se procederá a la extracción de aproximadamente 25-35 mililitros de sangre del paciente para proceder a continuación al aislamiento de las plaquetas. En los estudios de baja respuesta a antiagregantes, en el caso de los pacientes con SCA que reciban una dosis de carga del antiagregante objeto de estudio, se tomará una segunda muestra de sangre a las 24 h. Dicha extracción no supondrá ningún riesgo para el paciente abajo firmante.

Conservación de las muestras

Sus datos y muestras biológicas serán recogidos y conservados hasta terminar el estudio de modo **codificado**, que quiere decir que poseen un

código con el que el equipo investigador podrá conocer a quien pertenecen.

El responsable de la custodia de los datos y muestras *es el investigador principal*, y el lugar de realización de los análisis previstos en este estudio *es la Universidad de Santiago (Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas - CIMUS)*.

Al finalizar el estudio, conforme al RD 1716/2011, sus muestras biológicas serán destruidas.

Confidencialidad

El equipo de investigación mantendrá la **confidencialidad de los datos según** la Lei 15/1999 de protección de datos de carácter personal, así mismo teniendo derecho de **revocación del consentimiento** en cualquier momento poniéndose en contacto con:

Dr. _____

Teléfono. _____

Yo, _____

- *Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio necesarias.*
- *Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen mis datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*

- *Presto libremente mi conformidad para participar en este estudio.*

Santiago de Compostela, a _____ de 2017

Fdo.: El/la participante,

Fdo.: El investigador que
solicita el consentimiento



ANEXO IV. RESULTADOS AMPLIADOS DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PLAQUETARIA

Tabla suplementaria 1. Resultados ampliados del análisis de la vía de señalización mediante fosfoproteómica.

Uniprot	Descripción	FC	Anova	PTM	Gen	Proceso	Efecto PTM
O00429	<i>Dynammin-1-like protein</i>	1,71	0,030	S616	DNM1L	Formación de vesículas	No descrito
O14523	<i>Phospholipid transfer protein C2CD2L</i>	1,86	0,030	S660	C2CD2L	Regula la secreción de insulina en respuesta a la glucosa	No descrito
		1,86	0,030	S662			No descrito
O14545	<i>TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1</i>	1,76	0,028	S327	TRAFFD1	Respuesta inmune	No descrito
		2,03	0,017	S415			No descrito
O14639	<i>Actin-binding LIM protein 1</i>	3,76	0,001	S655	ABLIM1	Involucrado en la remodelación del citoesqueleto	No descrito
O14745	<i>Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1</i>	2,46	0,002	S290	SLC9A3R1	Involucrado en la remodelación del citoesqueleto	No tiene efecto
O15117	<i>FYN-binding protein</i>	2,41	0,019	S46	FYB1	Proteína adaptadora de Fyn y LCP	No descrito
		2,41	0,019	S52			No descrito
		4,47	0,016	S573			No descrito
		3,51	0,006	S571			Adhesión celular y asociación molecular
O15231-2	<i>Isoform 2 of Zinc finger protein 185</i>	2,60	0,030	S66	ZNF185	Proliferación y diferenciación celular	No descrito
		2,60	0,030	T68			No descrito
O43150	<i>Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2</i>	1,74	0,036	S820	ASAP2	Formación de vesículas	No descrito
		1,74	0,036	S822			No descrito
O43182	<i>Rho GTPase-activating protein 6</i>	1,68	0,024	S777	ARHGAP6	Involucrado en la remodelación del citoesqueleto	No descrito
		1,68	0,024	S772			No descrito
O43294	<i>Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein (Hic-5)</i>	1,56	0,029	S143	TGFB111	Adhesión celular	No tiene efecto
		1,56	0,029	S137			No tiene efecto
		1,56	0,029	S140			No tiene efecto
		1,56	0,029	S141			No tiene efecto
		1,62	0,012	S68			No tiene efecto
O43306	<i>Adenylate cyclase type 6</i>	3,02	0,016	S54	ADCY6	Involucrado en los receptores GPCRs	No descrito
		3,02	0,016	T56			No descrito
O43561	<i>Linker for activation of T-cells family member 1</i>	1,64	0,049	S40	LAT	Involucrado en las vías de señalización mediadas por integrina	No tiene efecto
		1,64	0,049	S43			No tiene efecto
O43741	<i>5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2</i>	49,75	0,021	S184	PRKAB2	Metabolismo celular	No descrito

O43768	<i>Alpha-endosulfine</i>	3,24	0,036	S67	ENSA	Mitosis	No descrito
O43847	<i>Nardilysin</i>	2,15	0,043	S94	NRDC	Proliferación celular	No descrito
O60229	<i>Kalirin</i>	1,47	0,041	S1757	KALRN	Involucrado en la remodelación del citoesqueleto	No descrito
		1,47	0,041	S1756			No descrito
		1,47	0,041	S1753			No descrito
		1,69	0,047	S2261			No descrito
O75069	<i>Transmembrane and coiled-coil domains protein 2</i>	1,75	0,032	S464	TMCC2	Implicado en las apolipoproteínas	No descrito
O75558	<i>Syntaxin-11</i>	1,81	0,011	T241	STX11	Involucrado en las SNAREs	No descrito
O75674	<i>TOM1-like protein 1</i>	2,27	0,046	S323	TOM1L1	Promueve la activación de FYN	No descrito
O75791	<i>GRB2-related adapter protein 2</i>	1,61	0,045	T262	GRAP2	Se une a Shc	No descrito
O94804	<i>Serine/threonine-protein kinase 10</i>	1,48	0,017	S191	STK10	Regula la migración de los linfocitos	No descrito
		1,48	0,017	T195			No descrito
		1,48	0,017	Y197			No descrito
		1,81	0,009	S438			No descrito
O94826	<i>Mitochondrial import receptor subunit TOM70 OS</i>	2,39	0,023	S91	TOMM70	Regula las proteínas mitocondriales	No descrito
		2,39	0,023	S96			No descrito
O94979	<i>Protein transport protein Sec31A</i>	1,59	0,005	S799	SEC31A	Involucrado en el transporte de vesículas	No descrito
O95810	<i>Serum deprivation-response protein</i>	1,61	0,020	T33	CAVIN2	Papel importante en la biogénesis caveolar	No descrito
		1,76	0,033	S288			No descrito
		1,76	0,033	S287			No descrito
		1,76	0,033	S293			No descrito
O95866	<i>Protein G6b</i>	3,11	0,034	S226	MPIG6B	Producción plaquetaria	Asociación molecular
		3,11	0,034	Y237			Asociación molecular
P02671	<i>Fibrinogen alpha chain</i>	1,68	0,006	S562	FGA	Agregación plaquetaria	No descrito
		1,58	0,006	T557			No descrito
		1,58	0,006	S561			No descrito
		1,58	0,006	T555			No descrito
		2,03	0,016	S542			No descrito
		2,03	0,016	T544			No descrito
		2,36	0,009	S549			No descrito

P02751	<i>Fibronectin</i>	1,52	0,031	S2384	FN1	Involucrada en adhesión celular	No descrito
P02765	<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>	3,44	0,009	S328	AHSG	Promueve endocitosis	No descrito
		3,44	0,009	S330			No descrito
P05106	<i>Integrin beta-3</i>	3,06	0,033	T788	ITGB3	Activación plaquetaria	No descrito
P06239	<i>Tyrosine-protein kinase Lck</i>	1,72	0,027	Y394	LCK	Regulador de la vía de la integrina	Actividad enzimática/Activación plaquetaria
P06241	<i>Tyrosine-protein kinase Fyn</i>	1,72	0,027	Y420	FYN	Regulador de la vía de la integrina	Actividad enzimática/Activación plaquetaria
P07947	<i>Tyrosine-protein kinase Yes</i>	1,72	0,027	Y426	YES1	Regulador de la vía de la integrina	Actividad enzimática/Activación plaquetaria i
P08559	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha</i>	7,87	0,028	S293	PDHA1	Glicolisis	No tiene efecto
		7,87	0,028	S300			Actividad enzimática
		7,87	0,028	S295			No tiene efecto
		5,36	0,023	T231			No tiene efecto
P11277-2	<i>Isoform 2 of Spectrin beta chain, erythrocytic</i>	1,84	0,003	S2299	SPTB	Formación de la actina	No descrito
P12931	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src</i>	1,72	0,027	Y419	SRC	Regulador de la vía de la integrina	Activación plaquetaria
P13224	<i>Platelet glycoprotein Ib beta chain</i>	1,52	0,006	S191	1BB	Receptor plaquetario	Adhesión celular/Activación plaquetaria
P15056	<i>Serine/threonine-protein kinase B-raf</i>	1,93	0,004	S363	BRAF	Proteína quinasa involucrada en señalización	No tiene efecto
		1,93	0,004	S365			Actividad enzimática
P16150	<i>Leukosialin</i>	3,06	0,011	S355	SPN	Regula la activación de las células T	No descrito
P16615	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2</i>	1,63	0,046	S663	ATP2A2	Disminuye los niveles de calcio intracelular	No descrito
P17252	<i>Protein kinase C alpha type</i>	1,65	0,036	S226	PRKCA	Función plaquetaria	Actividad enzimática/Asociación molecular
P21291	<i>Cysteine and glycine-rich protein 1</i>	2,02	0,030	S192	CSRP1	Desarrollo neuronal	No tiene efecto
P21333	<i>Filamin-A</i>	1,33	0,022	S2158	FLNA	Mantiene la organización del citoesqueleto plaquetario	No tiene efecto
		1,33	0,022	S2152			Reorganización del citoesqueleto
		1,47	0,046	S1459			Reorganización del citoesqueleto
		1,76	0,006	S2329			No tiene efecto
		2,40	0,007	S1081			No tiene efecto

		2,40	0,007	S1084			Reorganización del citoesqueleto/ Motilidad celular
P21731	<i>Thromboxane A2 receptor</i>	1,64	0,027	S331	TBXA2R	Receptor del tromboxano A2	Desensititation Actin cytoskeleton
P22307	<i>Non-specific lipid-transfer protein</i>	1,64	0,027	S352	SCP2	Involucrado en la distribución de lípidos	No descrito
P27105	<i>Erythrocyte band 7 integral membrane protein</i>	1,51	0,009	S10	STOM	Proteína clave en la degranulación	No descrito
P27708	<i>CAD protein</i>	1,47	0,037	S1859	CAD	Involucrado en el metabolismo celular	Actividad enzimática
P27824	<i>Calnexin</i>	143	0,012	S582	CANX	Endocitosis	No descrito
P27987	<i>Inositol-trisphosphate 3-kinase B</i>	2,40	0,004	T33	ITPKB	Molécula de transmisión de señal	No descrito
		2,73	0,024	T449			No descrito
		23,69	0,009	S166			No descrito
P28290	<i>Sperm-specific antigen 2</i>	1,81	0,021	S739	ITPRID2	-	No descrito
P29692	<i>Elongation factor 1-delta</i>	2,78	0,012	S133	EEF1D	-	Fosforilación
P29803	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, mitochondrial</i>	7,87	0,028	S291	PDHA2	Glicolisis	Actividad enzimática
		7,87	0,028	S298			No tiene efecto
		7,87	0,028	S293			No tiene efecto
P35606	<i>Coatomer subunit beta</i>	1,69	0,021	S859	COPB2	Tráfico de vesículas	No descrito
		1,69	0,021	T861			No descrito
P40189	<i>Interleukin-6 receptor subunit beta</i>	1,62	0,036	T670	IL6ST	Molécula de transmisión de señal	No tiene efecto
		1,63	0,036	S667			No tiene efecto
P42566	<i>Epidermal growth factor receptor substrate 15</i>	1,69	0,030	S108	EPS15	Tráfico de vesículas	No descrito
P42858	<i>Huntingtin</i>	4,59	0,017	S430	HTT	Tráfico de vesículas	No tiene efecto
		4,59	0,017	S432			No tiene efecto
P49757	<i>Protein numb homolog</i>	1,58	0,048	S438	NUMB	Neurogenesis	No descrito
P50402	<i>Emerin</i>	2,99	0,019	S57	EMD	Involucrada en el citoesqueleto	No descrito
		2,99	0,019	S54			No descrito
P51397	<i>Death-associated protein 1</i>	2,26	0,004	S51^	DAP	Involucrado en estabilidad celular	Autophagy
		3,51	0,035	T56			No descrito
		2,39	0,006	S51^			Autophagy
P56211	<i>cAMP-regulated phosphoprotein 19</i>	3,24	0,036	S62	ARPP19	Mitosis	No descrito
P78344	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2</i>	2,40	0,0007	T508	EIF4G2	Involucrado en mitosis	Asociación molecular
P98171	<i>Rho GTPase-activating protein 4</i>	1,47	0,041	S906	ARHGAP4	Involucrada en el citoesqueleto	No descrito

Q00013	55 kDa erythrocyte membrane protein	1,63	0,0003	S243	MPP1	Involucrada en la polaridad de neutrófilos	Localización intracelular
Q01082	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	1,75	0,010	T2187	SPTBN1	Involucrada en secreción	No descrito
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	1,95	0,035	S386	PFKP	Glicolisis	No descrito
Q04759	Protein kinase C theta type	2,05	0,021	T536	PRKCQ	Activación plaquetaria	No descrito
		2,54	0,003	S695*			Actividad enzimática
		2,07	0,001	S695*			Regulación de las vías de señalización
		2,05	0,021	T538			
Q05682	Caldesmon	2,01	0,039	S759	CALD1	Organización del citoesqueleto	Motilidad celular
Q05682-4	Isoform 4 of Caldesmon	1,48	0,024	S202	CALD1	Organización del citoesqueleto	No tiene efecto
Q07866-4	Isoform J of Kinesin light chain 1	1,61	0,045	S600	KLC1	Organización del citoesqueleto	No descrito
Q08495	Dematin	1,30	0,014	S372	DMTN	Organización del citoesqueleto	No descrito
		1,46	0,031	S333			No descrito
		1,30	0,014	S377			No descrito
		1,77	0,012	S96			No descrito
		1,77	0,012	S92			No descrito
Q0ZGT2	Nexilin	1,65	0,011	S365	NEXN	Organización del citoesqueleto	No descrito
Q12912	Lymphoid-restricted membrane protein	1,78	0,005	S131	LRMP	Inflamación	No descrito
Q12982	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 2	1,41	0,032	S114	BNIP2	Apoptosis	No descrito
Q13045	Protein flightless-1 homolog	1,94	0,008	S856	FLII	Organización del citoesqueleto	No descrito
Q13094	Lymphocyte cytosolic protein 2	2,15	0,019	S207	LCP2	Inflamación	No tiene efecto
Q13283	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	2,20	0,026	S232	G3BP1	Degranulación	Asociación y regulación molecular
Q13586	Stromal interaction molecule 1	1,47	0,030	S618	STIM1	Calcium modulation	No tiene efecto
		1,47	0,030	S620			No tiene efecto
		2,50	0,012	S519			No tiene efecto
Q13627	Dual specificity tyrosine-Fosforilación-regulated kinase 1A	1,98	0,007	Y231	DYRK1A	Actividad quinasa	Autocatalisis
Q13884	Beta-1-syntrophin	1,68	0,042	S87	SNTB1	Organización de proteínas de membrana	No descrito
Q13976	cGMP-dependent protein kinase 1	1,33	0,039	T517	PRKG1	Transporte de vesículas	Fosforilación
		1,33	0,039	T521			No tiene efecto
Q14141	Septin-6	1,36	0,033	S416	SEPT6	Organización del citoesqueleto	No descrito
		2,85	0,020	T418			No descrito

Q14155	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 7</i>	3,20	0,003	S517	ARHGEF6	Señalización plaquetaria	Motilidad celular
Q14247	<i>Src substrate cortactin</i>	1,68	0,016	T401	CTTN	Tranporte de vesículas	Localización intracelular
		3,25	0,033	S417			No tiene efecto
Q14432	<i>cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase A</i>	3,72	0,032	S520	PDE3A	Involucrado en segundos mensajeros	No tiene efecto
Q14677	<i>Claothrin interactor 1</i>	4,18	0,027	T294	CLINT1	Transporte de vesículas	No descrito
		4,18	0,027	S299			No descrito
Q14847	<i>LIM and SH3 domain protein 1</i>	2,08	0,029	S146	LASP1	Organización del citoesqueleto	Asociación y regulación molecular
		2,08	0,029	Y152			No tiene efecto
		1,86	0,047	S150			No tiene efecto
		1,71	0,019	S134			No tiene efecto
Q15052	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 6</i>	3,20	0,003	S488	ARHGEF6	Señalización plaquetaria	Motilidad celular
Q15366	<i>Poly(rC)-binding protein 2</i>	2,20	0,036	S189	PCBP2	Involucrado en el ARNm	No descrito
Q15942	<i>Zyxin</i>	1,72	0,042	S308	ZYG	Proteína de adhesión	No tiene efecto
		1,72	0,042	S313			No tiene efecto
		1,72	0,042	S303			No tiene efecto
Q16181	<i>Septin-7</i>	1,79	0,045	T426	SEPT7	Organizaicón del citoesqueleto	No descrito
		1,76	0,045	S424			No descrito
Q16643	<i>Drebrin</i>	1,87	0,033	S337	DBN1	Organizaicón del citoesqueleto	No tiene efecto
		1,85	0,003	S339			No tiene efecto
		1,85	0,003	S341			No tiene efecto
		1,87	0,033	T335			No tiene efecto
Q16799	<i>Reticulon-1</i>	1,73	0,030	S350	RTN1	Secreción endocrina	No descrito
		2,88	0,005	S71			No descrito
		1,91	0,002	S487*			No descrito
		1,71	0,030	S352			No descrito
		2,46	0,041	S487*			No descrito
Q2M2I8	<i>AP2-associated protein kinase 1</i>	2,27	0,016	S637	AAK1	Transporte de vesículas	No descrito
Q32M24	<i>Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1</i>	3,31	0,015	S115	LRRFIP1	Señalización	No descrito
		3,31	0,015	S116			No descrito
Q4KMP7	<i>TBC1 domain family member 10B OS</i>	2,01	0,036	S687	TBC1D10B	Señalización	No descrito
Q53ET0	<i>CREB-regulated transcription coactivator 2</i>	3,39	0,006	S70	CRTC2	Señalización por SIK/TORC	No descrito

Q5JSH3	<i>WD repeat-containing protein 44</i>	2,85	0,031	S561	WDR44	Tráfico de vesículas	No descrito
Q5M775	<i>Cytospin-8</i>	1,77	0,032	S55	SPECC1		No descrito
Q5T1M5	<i>FK506-binding protein 15</i>	1,53	0,010	S311	FKBP15	Tráfico de vesículas	No descrito
		2,09	0,009	S960			No descrito
		2,09	0,009	S962			No descrito
		2,09	0,009	S956			No descrito
Q5T4S7	<i>E3 ubiquitin-protein ligase UBR4</i>	1,69	0,023	T2715	UBR4	Ubiquitinación	No descrito
		1,69	0,023	T2719			No descrito
Q5T5U3	<i>Rho GTPase-activating protein 21</i>	1,79	0,012	S742	ARHGAP21	Formación en el aparato de Golgi	No descrito
		1,91	0,010	S1860			No descrito
		1,79	0,012	T746			No descrito
		2,41	0,041	S318			No descrito
Q5T5Y3	<i>Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1</i>	2,49	0,039	S563	CAMSAP1	Organización del citoesqueleto	No descrito
Q5T9C9	<i>Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase-like protein 1</i>	1,44	0,037	S313	PIP5KL1	Organización del citoesqueleto	No descrito
Q5VY43	<i>Platelet endothelial aggregation receptor 1</i>	1,85	0,034	S953	PEAR1	Receptor plaquetario	No descrito
Q684P5	<i>Rap1 GTPase-activating protein 2</i>	1,47	0,006	S45	RAP1GAP2	Señalización plaquetaria	No descrito
		1,47	0,006	T49			No descrito
Q6IQ22	<i>Ras-related protein Rab-12</i>	2,04	0,013	S21	RAB12	Tráfico de vesículas	No descrito
Q6P2E9	<i>Enhancer of mRNA-decapping protein 4</i>	1,79	0,018	T272	EDC4	Involucrada en el ARNm	No descrito
		1,79	0,018	S735			No descrito
		1,79	0,018	S729			No descrito
Q6P9F0	<i>Coiled-coil domain-containing protein 62</i>	2,02	0,037	T22	CCDC62	-	No descrito
Q6PKG0	<i>La-related protein 1</i>	2,16	0,037	S766	LARP1	Involucrada en el ARNm	No descrito
Q6VY07	<i>Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1</i>	3,12	0,003	T504	PACS1	Transporte de vesículas	No descrito
Q6WCQ1	<i>Myosin phosphatase Rho-interacting protein</i>	1,63	0,025	S540	MPRIP	Organización del citoesqueleto	No descrito
		1,63	0,025	T542			No descrito
Q6Y7W6	<i>GRB10-interacting GYF protein 2</i>	1,47	0,043	S236	GIGYF2	Regula las tirosinas quinasas	No descrito
Q6ZJ1	<i>Neurobeachin-like protein 2</i>	1,77	0,020	S757	NBEAL2	Involucrada en degranulación plaquetaria	No descrito
Q6ZVM7	<i>TOM1-like protein 2</i>	1,43	0,018	S423	TOM1L2	Tráfico de vesículas	No descrito
		1,43	0,018	S424			No descrito
Q70J99	<i>Protein unc-13 homolog D</i>	1,44	0,019	S150	UNC13D	Tráfico de vesículas	No descrito

		1,44	0,019	S153			No descrito
Q7KZ17	<i>Serine/threonine-protein kinase MARK2</i>	1,82	0,026	S571	MARK2	Organización del citoesqueleto	No tiene efecto
Q7L591	<i>Docking protein 3</i>	1,38	0,043	T329	DOK3	Proteína de señalización	No descrito
		1,38	0,043	S330			No descrito
Q7LDG7	<i>RAS guanyl-releasing protein 2</i>	1,72	0,024	T396	RASGRP2	Agregación plaquetaria	No descrito
		1,72	0,024	T399			No descrito
		1,72	0,024	T411			No descrito
Q7Z3D4	<i>LysM and putative peptidoglycan-binding domain-containing protein 3</i>	2,45	0,036	S55	LYSMD3		No descrito
Q7Z401	<i>C-myc promoter-binding protein</i>	2,10	0,0009	S1587	DENND4A	Involucrada en señalización celular	No descrito
		2,10	0,0009	S1589			No descrito
		3,18	0,043	S1511			No descrito
		3,18	0,043	T1512			No descrito
Q7Z5P9	<i>Mucin-19</i>	1,81	0,009	T5860	MUC19		No descrito
		1,81	0,009	T5866			No descrito
Q86TV6	<i>Tetratricopeptide repeat protein 7B</i>	1,32	0,025	S160	TTC7B	Involucrada en señalización celular	No descrito
Q86UX7	<i>Fermitin family homolog 3</i>	2,12	0,030	S484	FERMT3	Activa la vía de la integrina	Adhesión celular/ Motilidad celular
		6,66	0,009	S8			No tiene efecto
Q86WR7	<i>Proline and serine-rich protein 2</i>	1,30	0,038	T43	PROSER2		No descrito
Q8IZD0	<i>Sterile alpha motif domain-containing protein 14</i>	3,08	0,004	S153	SAMD14	Organización del citoesqueleto	No descrito
		3,08	0,004	S151			No descrito
Q8IZP0	<i>Abl interactor 1</i>	3,41	0,012	S183	ABI1	Reorganización del citoesqueleto	Motilidad celular/ Organización del citoesqueleto
		3,41	0,012	T178			No tiene efecto
Q8IZR5	<i>CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 4</i>	2,10	0,017	S194	CMTM4	Proceso inmune	No descrito
Q8N5C8	<i>TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 3</i>	1,81	0,016	S101	TAB3	Mediador de la activación de MAP3K7	No tiene efecto
		1,81	0,016	S102			No tiene efecto
Q8N699	<i>Myc target protein 1</i>	2,40	0,049	T143	MYCT1		No descrito
Q8ND56	<i>Protein LSM14 homolog A</i>	2,11	0,004	S216*	LSM14A	Formación de cuerpos P	No descrito
		2,46	0,007	S216*			No descrito
Q8TEW0	<i>Partitioning defective 3 homolog</i>	2,34	0,023	S144	PARD3	Citoesqueleto	Reorganización del citoesqueleto
Q8WWA1	<i>Transmembrane protein 40</i>	1,46	0,010	S414	TMEM40		No descrito
		1,41	0,021	S137			No descrito

Q92538	<i>Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1</i>	2,75	0,036	Y1316	GBF1	Tráfico de vesículas	No tiene efecto
		2,75	0,036	S1318			No tiene efecto
Q92614	<i>Unconventional myosin-XVIIIa</i>	1,56	0,001	S2020	MYO18A	Tráfico de vesículas	No descrito
Q92619	<i>Minor histocompatibility protein HA-1</i>	1,48	0,012	S569	ARHGAP45	Ciclo de Rho GTPasa	No descrito
		1,65	0,0008	S25			No descrito
		1,65	0,0008	S23			No descrito
Q92974	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor 2</i>	1,68	0,036	S174	ARHGEF2	Ciclo de Rho GTPasa	No tiene efecto
		2,20	0,004	S151			Reorganización del citoesqueleto
Q969X1	<i>Protein lifeguard 3</i>	1,56	0,004	S81	TM6IM1	Remodelación vascular	No descrito
		1,56	0,004	S83			No descrito
Q96C24	<i>Synaptotagmin-like protein 4</i>	1,41	0,040	S274	SYTL4	Tráfico de vesículas	No descrito
		1,41	0,040	S269			No descrito
		1,77	0,041	S74			No descrito
		1,43	0,038	S217			No descrito
Q96KP1	<i>Exocyst complex component 2</i>	1,42	0,037	S416	EXOC2	Tráfico de vesículas	No descrito
Q96TC7	<i>Regulator of microtubule dynamics protein 3</i>	1,88	0,046	S46	RMDN3	Regulación del calcio intracelular	No tiene efecto
Q99501	<i>GAS2-like protein 1</i>	2,33	0,045	S492	GAS2L1	Reorganización del citoesqueleto	No descrito
		2,33	0,045	S490			No descrito
		1,97	0,040	S306			No descrito
		1,97	0,040	S279			No descrito
Q99576-3	<i>Isoform 2 of TSC22 domain family protein 3</i>	1,68	0,012	S42	TSC22D3	Apoptosis	No descrito
Q99599	<i>Plakophilin-2</i>	6,39	0,019	S82	PKP2	Adhesión celular	No descrito
Q9BV40	<i>Vesicle-associated membrane protein 8</i>	1,83	0,048	S55	VAMP8	Tráfico de vesículas	Actividad inhibitoria
Q9BZL6	<i>Isoform 3 of Serine/threonine-protein kinase D2</i>	1,68	0,040	S197	PRKD2	Tráfico de vesículas	No descrito
		1,68	0,040	S199			No descrito
Q9H019	<i>Mitochondrial fission regulator 1-like</i>	1,92	0,040	S103	MTFR1L		No descrito
Q9H3Z4	<i>DnaI homolog subfamily C member 5</i>	1,49	0,036	S10	DNAJC5	Tráfico de vesículas	Exocitosis
Q9H4X1	<i>Regulator of cell cycle RGCC</i>	2,13	0,005	T99	RGCC	Ciclo celular	No descrito
		2,13	0,005	T102			No descrito
		2,13	0,005	S87			No descrito
		2,13	0,005	S89			No descrito
		2,13	0,005	T91			No descrito

Q9NQ75	<i>Cas scaffolding protein family member 4</i>	1,79	0,020	S289*	CASS4	Señalización basada en tirosina quinasa	No descrito
		2,13	0,049	S200			No descrito
		3,17	0,0005	S289*			No descrito
		3,47	0,003	T233			No descrito
		1,88	0,013	S289*			No descrito
Q9NQC3	<i>Reticulon-4</i>	1,48	0,048	T188	RTN4	Reorganización del citoesqueleto	No descrito
		1,48	0,048	S184			No descrito
Q9NQC3-2	<i>Isoform 2 of Reticulon-4</i>	1,92	0,020	S181	RTN4	Reorganización del citoesqueleto	No descrito
		1,92	0,020	S184			No descrito
Q9NQG7	<i>Hermansky-Pudlak syndrome 4 protein</i>	2,03	0,019	S355	HPS4		No descrito
Q9NR19	<i>Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic</i>	2,18	0,004	S30	ACSS2	Síntesis de lípidos	No descrito
		2,18	0,004	S36			No descrito
Q9NRA8	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter</i>	2,71	0,028	S564	EIF4ENIF1	Inhibe la transducción de proteínas	No tiene efecto
Q9NS28	<i>Regulator of G-protein signaling 18</i>	2,04	0,011	S216	RGS18	Actividad GTPasa	Asociación y regulación molecular
		2,04	0,011	S218			Asociación y regulación molecular
		2,04	0,011	T220			No tiene efecto
Q9NZM3	<i>Intersectin-2</i>	2,16	0,033	S889	ITSN2	Tráfico de vesículas	No descrito
Q9P266	<i>Junctional protein associated with coronary artery disease</i>	3,77	0,013	S1044	JCAD		No descrito
Q9UBC2	<i>Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1 OS</i>	4,41	0,038	S255	EPS15L1	Tráfico de vesículas	No descrito
Q9UBP0	<i>Spastin</i>	1,42	0,037	S245	SPAST	Tráfico de vesículas	No descrito
		1,42	0,037	S243			No descrito
Q9UBW5	<i>Bridging integrator 2</i>	2,74	0,028	S273	BIN2	Promueve motilidad celular	No descrito
		2,81	0,029	S440			No descrito
		2,81	0,029	S444			No descrito
		4,07	0,003	T423			No descrito
Q9UDY2	<i>Tight junction protein ZO-2</i>	1,59	0,011	S961	TJP2	Adhesión celular	No descrito
		1,59	0,011	S966			No descrito
Q9UEY8	<i>Gamma-adducin</i>	1,59	0,017	S681	ADD3	Reorganización del citoesqueleto	No descrito
		1,59	0,017	S683*			No descrito

		1,69	0,048	S683*			No descrito
Q9UHY1	Nuclear receptor-binding protein	2,40	0,011	T433	NRBP1	Tráfico de vesículas	No descrito
Q9UK76	Jupiter microtubule associated homolog 1	3,30	0,013	S87	JPT1	Modula negativamente la señalización por AKT-GSK3B	No descrito
		3,30	0,013	S88			No descrito
Q9UKE5	TRAF2 and NCK-interacting protein kinase	1,48	0,034	S707	TNIK	Respuesta ante estrés	No descrito
		1,79	0,03	S680			No descrito
		1,72	0,004	S769			No descrito
Q9ULH1	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	1,67	0,030	S839	ASAP1	Ciliogenesis	No tiene efecto
Q9ULQ0	Striatin-interacting protein 2	2,03	0,031	S318	STRIP2	Organización del citoesqueleto	No descrito
Q9UNE7	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP	1,90	0,008	S19	STUB1	Respuesta inmune	No tiene efecto
Q9UP83	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 5	2,27	0,026	S197	COG5	Función en el aparato de Golgi	No descrito
Q9UPN4	Centrosomal protein of 131 kDa	2,04	0,019	T96	CEP131	Formación de cilios y flagelos	No descrito
		2,04	0,019	T89			No descrito
		2,04	0,019	T93			No descrito
Q9UPU5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24	2,21	0,025	T2559	USP24		No descrito
		2,21	0,025	S2561			No descrito
		2,21	0,025	T2565			No descrito
Q9Y210	Short transient receptor potential channel 6	1,27	0,042	S815*	TRPC6	Regula calcio intracelular	No descrito
		1,51	0,037	S815*			No descrito
Q9Y219	TBC1 domain family member 30	1,44	0,044	S292	TBC1D30	GTPasa	No descrito
Q9Y2L6	FERM domain-containing protein 4B	1,80	0,034	S296	FRMD4B	Involucrada en la señalización de la insulina	No descrito
		2,21	0,037	S778			No descrito
		2,26	0,007	S675			No descrito
Q9Y2X7	ARF GTPase-activating protein GIT1	1,93	0,048	S362	GIT1	Tráfico de vesículas	No tiene efecto
		1,93	0,048	T364			No tiene efecto
Q9Y385	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 J1	1,79	0,011	S266	UBE2J1	Degradación de proteínas de membrana	No tiene efecto
Q9Y3Q8	TSC22 domain family protein 4	2,12	0,036	S165	TSC22D4	Represor transcripcional	No descrito
Q9Y463	Dual specificity tyrosine-Fosforilación-regulated kinase 1B	1,98	0,007	Y273	DYRK1B	Actividad quinasa	Autocatalisis
Q9Y4H4	G-protein-signaling modulator 3	3,33	0,028	T45	GPSM3	Regula la actividad de las proteínas G	No descrito
		3,33	0,028	S39			No descrito
Q9Y608		1,63	0,009	S328	LRRFIP2		No descrito

	<i>Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2</i>	1,63	0,009	S333		Regula la señalización mediante TL	No descrito
		2,87	0,021	S309			No descrito
Q9Y6D5	<i>Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2</i>	1,94	0,017	S227	ARFGEF2	Tráfico de vesículas	No descrito
Q9Y6F6	<i>Protein MRVI1</i>	1,70	0,043	S339	MRVI1	Agregación plaquetaria	No descrito
		1,70	0,043	T341			No descrito



ANEXO V, LISTA DE PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL PERIODO DE TESIS

Publicaciones cuyo contenido se incluye en la presente tesis doctoral:

1, Barrachina MN, Hermida-Nogueira L, Moran LA, Casas V, Hicks SM, Sueiro AM, Di Y, Andrews RK, Watson SP, Gardiner EE, Abián J, Carrascal M, Pardo M, García Á, A phosphoproteomic analysis of platelets in obesity uncovers platelet reactivity and signalling pathways alterations. Blood. En revision.

2, Barrachina MN, Moran LA, Izquierdo I, Casanueva FF, Pardo M, García Á, Analysis of platelets from a diet-induced obesity rat model: elucidating platelet dysfunction in obesity, Platelets, 2º Revision

3, Barrachina MN, Sueiro AM, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, Guitián E, Casanueva FF, Farndale RW, Moroi M, Jung SM, Pardo M, García Á. GPVI surface expression and signalling pathway activation are increased in platelets from obese patients: Elucidating potential anti-atherothrombotic targets in obesity. Atherosclerosis. 2018;281:62-70. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.023.

4. Barrachina MN, Sueiro AM, Casas V, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, Guitián E, Casanueva FF, Abián J, Carrascal M, Pardo M, García Á. A Combination of Proteomic Approaches Identifies A Panel of Circulating Extracellular Vesicle Proteins Related to the Risk of Suffering Cardiovascular Disease in Obese Patients. Proteomics. 2019;19(1-2):e1800248. DOI 10.1002/pmic.201800248.

5. **Barrachina MN**, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, Sueiro AM, Guitián E, Casanueva FF, Farndale RW, Moroi M, Jung SM, Pardo M, **García Á**. Data on hyper-activation of GPVI signalling in obese patients: towards the identification of novel antiplatelet targets in obesity. Data brief. 2019;23:103784. DOI 10.1016/j.dib.2019.103784

Otras publicaciones de la doctoranda como autora principal:

1. **Barrachina MN**, **García Á**. Clinical proteomics for the analysis of Extracellular Vesicles. Capítulo de Libro. Methods in Shotgun Proteomics Springer Nature. En impresión.

2. **Barrachina MN**, Calderón-Cruz B, Fernandez-Rocca L, **García Á**. Application of Extracellular Vesicles Proteomics to Cardiovascular Disease: Guidelines, Data Analysis, and Future Perspectives. Proteomics. 2019 Jan;19(1-2):e1800247. doi: 10.1002/pmic.201800247.

Otras publicaciones:

1. Izquierdo I, **Barrachina MN**, Hermida-Nogueira L, Casas V, Morán LA, Lacerenza S, Pinto-Llorente R, Eble JA, de Los Ríos V, Domínguez E, Loza MI, Casal JI, Carrascal M, Abián J, **García A**. A Comprehensive Tyrosine Phosphoproteomic Analysis Reveals Novel Components of the Platelet CLEC-2 Signaling Cascade. Thromb Haemost. 2020 Feb;120(2):262-276. doi: 10.1055/s-0039-3400295. Epub 2020 Jan 4.

2. Hermida-Nogueira L, **Barrachina MN**, Izquierdo I, **García-Vence M**, Lacerenza S, Bravo S, Castrillo A, **García Á**. Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from platelet concentrates treated with Mirasol®

identifies biomarkers of platelet storage lesion. J Proteomics. 2020 Jan 6;210:103529. doi: 10.1016/j.jprot.2019.103529. Epub 2019 Oct 9.

3. Izquierdo I, Barrachina MN, Hermida-Nogueira L, Casas V, Eble JA, Carrascal M, Abián J, García Á. Platelet membrane lipid rafts protein composition varies following GPVI and CLEC-2 receptors activation. J Proteomics. 2019 Mar 20;195:88-97. doi: 10.1016/j.jprot.2019.01.014. Epub 2019 Jan 22.





Declaración de conflicto de interés

La doctoranda declara que no existe ningún tipo de conflicto de interés en el desarrollo de la presente tesis doctoral.

A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the center of the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, bold, sans-serif font, with the full name 'UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller, all-caps, sans-serif font below it.

En Santiago de Compostela, 16 de Marzo 2020

Fdo. María Núñez Barrachina